



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS CONVENCIONAIS E
ALTERNATIVOS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU E
PROCESSADO**

ANDRÉIA CIROLINI

FLORIANÓPOLIS

2012

ANDRÉIA CIROLINI

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS CONVENCIONAIS E
ALTERNATIVOS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU E
PROCESSADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a Cleide Rosana Werneck Vieira, Ph.D.

Florianópolis

2012

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS CONVENCIONAIS E ALTERNATIVOS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU E PROCESSADO

Por

Andréia Cirolini

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor
no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela
comissão formada por:

Prof^ª Dr^a. Cleide Rosana Werneck Vieira, Ph.D.
UFSC (Orientadora)

Prof^ª Dr^a. Leadir Lucy Martins Fries, Ph.D.
UFSM

Prof. Dr. Paulo Rogério Franckin
UNOESC

Prof^ª. Dr^a. Roberta Juliano Ramos
FES

Prof^ª. Dr^a. Elane Schwinden Prudêncio
UFSC

Florianópolis, 07 de dezembro de 2012

Dedico este trabalho aos meus pais,
Oscar (*in memoriam*) e Célia,
exemplos de vida e de valores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me iluminar sempre!

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Superintendência Federal de Agricultura em Santa Catarina (SFA/SC) pela importante parceria;

Os laticínios participantes da pesquisa e equipes responsáveis pela coleta pelo incansável auxílio na execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) pela bolsa cedida e pelo apoio financeiro, através do Projeto em parceria com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimentos (MAPA) e Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA).

À minha orientadora, professora Cleide Rosana Werneck Vieira, por me aceitar em sua equipe. Agradeço pelos ensinamentos passados, pela confiança e amizade. Agradeço a oportunidade que me deste.

Ao Professor Paulo Ogliari, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas do laboratório de microbiologia de alimentos, pela convivência e pelas experiências compartilhadas, pela amizade. A estagiária, Andressa, que esteve junto em todos os momentos, agradeço pelo companherismo e ajuda na realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Extensão, secretaria do CAL, agradeço pela ajuda e paciência na realização deste trabalho.

Aos colegas de aula, que se tornaram amigos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, em especial ao Sergio, Carlos, Bento, pela colaboração direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Pessoas especiais que conheci em Florianópolis e que me acolheram D.Leni, Neia, Jane, agradeço pelo apoio e pela convivência neste período.

A minha mãe, Célia, que me apoiou, rezando, incentivando, acompanhando de perto os desafios, dificuldades e conquistas no decorrer deste doutorado.

Ao meu noivo, Vagner, pelo carinho, amor, apoio, força, paciência. Agradeço por me incentivar sempre e me acalmar.

A minha família, em especial aos meus irmãos, aos meus cunhados, meus sobrinhos por torcer para que tudo desse certo.

Muito Obrigada!

Cirolini, A. **Comparação de Métodos Convencionais e Alternativos em Amostras de Leite Cru e Processado**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

O controle microbiológico na indústria láctea tem uma importância muito grande, uma vez que o leite é um excelente meio de cultura para a multiplicação de microrganismos em virtude das suas características intrínsecas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do leite cru, pasteurizado e UHT proveniente de laticínios do estado de Santa Catarina em diferentes épocas do ano e avaliar o desempenho de métodos alternativos de contagem e de detecção de microrganismos em leite pasteurizado. As amostras foram monitoradas de dezembro de 2009 a novembro de 2011. Nas amostras de leite cru foram pesquisadas a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicotróficos e *Staphylococcus aureus*. Nas amostras de leite pasteurizado foram avaliadas a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicotróficos, *Enterobacteriaceae*, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. Nas amostras de leite UHT, as avaliações foram feitas por meio da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e psicotróficos. Para o desempenho dos métodos alternativos, avaliou-se o sistema VIDAS® em comparação à metodologia convencional para detecção de *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* spp em leite pasteurizado. Também avaliou-se o sistema Petrifilm™ e sistema TEMPO® com a metodologia convencional para ensaios em leite pasteurizado por meio da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, *Enterobacteriaceae*, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C (com exceção para o sistema Tempo®, que não disponibiliza tal metodologia) e *Escherichia coli*. A avaliação de métodos também foi realizada em amostras de leite pasteurizado artificialmente contaminado por meio da contagem de *Enterobacteriaceae*. Também foi avaliado o sistema Petrifilm™ HS (alta sensibilidade) na contagem de Coliformes. Os resultados indicaram altas contagens de mesófilos aeróbios e psicotróficos no leite cru. No leite pasteurizado as amostras não apresentaram conformidade com o padrão estabelecido pela legislação para mesófilos aeróbios, *Enterobacteriaceae*, Coliformes a 35°C e *Escherichia coli* no leite. As amostras do leite UHT apresentaram resultados de acordo com a legislação. Nenhum resultado positivo para

Escherichia coli O157 H7 e *Salmonella* foi encontrado nas amostras de leite pasteurizado tanto pelo método convencional como pelo sistema VIDAS[®]. Uma alta correlação foi encontrada entre as metodologias alternativas e a metodologia convencional para o ensaio de *Enterobacteriaceae* e Coliformes a 35°C. Todavia, nos ensaios de mesófilos aeróbios, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* os coeficientes de correlação foram baixos. Não foi observada diferença estatística entre os três métodos analisados com leite pasteurizado artificialmente contaminado com *Enterobacteriaceae* nos três níveis de inóculo. O sistema Petrifilm[™] HS para contagem de Coliformes a 35°C mostrou resultados satisfatórios em leite pasteurizado e uma baixa performance para a contagem de Coliformes a 45°C. Pode-se concluir que há necessidade de investimentos em programas de boas práticas agrícolas e de fabricação para assegurar a qualidade do leite cru e pasteurizado. E os métodos alternativos mostraram resultados satisfatórios para o ensaio de *Enterobacteriaceae* e Coliformes a 35°C em leite pasteurizado e uma baixa performance para mesófilos aeróbios, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli*.

Palavras- chave: leite. qualidade. microrganismos. Sistema Petrifilm[™]. Sistema TEMPO[®]. sistema VIDAS[®]

Cirolini, A. **Comparison of Conventional and Alternative methods in samples of raw milk and processed.** 2012. Thesis (Doctorate in Food Science) – Post-Graduation Program in Food Science, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

ABSTRACT

Microbiological control plays an important role on the dairy industry once, due to its intrinsic characteristics, milk is considered an excellent culture medium for multiplication microorganisms. The aim of the present work was to analyze the microbiological quality of raw, pasteurized and UHT milk from the State of Santa Catarina in different seasons as well as evaluate the performance of alternative methods for counting and detecting microorganisms in pasteurized milk. Samples were monitored from December 2009 to November 2011. Mesophilic aerobic bacteria, psychrotrophic bacteria and *Staphylococcus aureus* countings were performed in raw milk samples. Mesophilic aerobic bacteria, psychrotrophic bacteria, *Enterobacteriaceae*, Coliforms at 35°C, Coliforms at 45°C, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 countings were performed in pasteurized milk. Mesophilic aerobic bacteria and psychrotrophic bacteria countings were performed in UHT milk samples. In order to evaluate the performance of alternative methods compared to the conventional methods, VIDAS® system was tested for detecting *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp in pasteurized milk. Petrifilm™ and TEMPO® systems were also evaluated for pasteurized milk by counting of mesophilic aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, Coliforms at 35°C, Coliforms at 45°C (except for Tempo® system, which for the methodology is not available) and *Escherichia coli* microorganism. Evaluation of methods was also performed on samples of pasteurized milk artificially contaminated with *Enterobacteriaceae*. Petrifilm™ HS (high sensibility) was tested for Coliforms countings. Results showed high counts of mesophilic aerobic bacteria and psychrotrophic bacteria in raw milk. Results were not in accordance with the legislation for mesophilic aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, Coliforms at 35°C and *Escherichia coli* in pasteurized milk samples. Results for UHT samples were in agreement with the regulations. Positive results were not found for *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in pasteurized milk samples through both methods, conventional and VIDAS®. High correlation was found between the alternative and the conventional methods for *Enterobacteriaceae* and Coliforms at 35°C, but low

correlation for mesophilic aerobic bacteria, Coliforms at 45°C and *Escherichia coli*. No significant statistical difference was found among the three methods analyzed with pasteurized milk artificially contaminated with *Enterobacteriaceae* in three levels of inoculum. Petrifilm™ HS analyses presented satisfactory results for Coliforms at 35°C but low performance for Coliforms at 45°C in pasteurized milk. There is an urgent need of investments in programs supporting agricultural and manufacturing good practices in order to ensure the quality of raw and pasteurized milk. Alternative methods presented satisfactory results for *Enterobacteriaceae* and Coliforms at 35°C in pasteurized milk, low performance for mesophilic aerobic bacteria, Coliforms at 45°C and *Escherichia coli*.

Key-words: milk. quality. microorganisms. Petrifilm™ System. TEMPO® System. VIDAS® System.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 – Distribuição geográfica de microrregiões produtoras de leite no Brasil, 2010.....	31
Figura 2 - Fluxograma da Pasteurização rápida.....	42
Figura 3 - Fluxograma do processo UHT.....	44
Figura 4 - Mini VIDAS® BioMérieux S.A.....	48
Figura 5 - Barrete ® BioMérieux S.A.....	48
Figura 6 - Esquema ELFA.....	49
Figura 7 - Placa de Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA).....	50
Figura 8 - Inoculação em Placa de Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA).....	51
Figura 9 - Visualização do crescimento de colônias típicas em placas de Petrifilm™.....	53
Figura 10 - Ilustração do sistema TEMPO® (Biomérieux S.A.).....	55

Capítulo 2

Figura 1 - Médias geométricas da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (log UFC/mL) no leite cru proveniente de laticínios do estado de SC analisadas por trimestre por dois anos em relação à Instrução Normativa.....	77
---	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Maiores países produtores de leite no mundo.....	30
--	----

Capítulo 2

Tabela 1. Contagens médias de microrganismos no leite pasteurizado proveniente de laticínios do estado de SC analisado por trimestre por dois anos em relação ao padrão máximo permitido pela legislação vigente.....	79
---	----

Capítulo 3

Tabela 1. Contagens médias em \log_{10} UFC/mL de mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> através do método convencional, sistema Petrifilm™ e sistema TEMPO® em amostras de leite pasteurizado.....	96
Tabela 2. Coeficiente de Correlação (r) obtido pelo ensaio de mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> (Log UFC/mL) pelo método convencional frente ao sistema Petrifilm™ e o sistema TEMPO® em amostras de leite pasteurizado.....	97
Tabela 3. Tempo (em horas) para o resultado final do ensaio de mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> pela metodologia convencional, sistema Petrifilm™ e sistema Tempo®	98

Capítulo 4

Tabela 1. Parâmetros estatísticos obtidos pelo ensaio de <i>Enterobacteriaceae</i> (Log UFC mL ⁻¹) pelo método ISO 21528:2 e o sistema Petrifilm™ EB e entre o método ISO 21528:2 e o sistema TEMPO® EB pela microflora do leite pasteurizado e artificialmente contaminadas e leite UHT artificialmente contaminadas.....	115
--	-----

Tabela 2. Contagens médias em log UFC mL⁻¹ de *Enterobacteriaceae* e de uma cepa não pertencente à família *Enterobacteriaceae* através do método ISO 21528:2, sistema Petrifilm™ EB e sistema TEMPO® EB em diferentes níveis de inóculo adicionadas artificialmente em amostras de leite pasteurizado e UHT.....116

Capítulo 5

Tabela 1. Coeficiente de Correlação (r) obtido pelo ensaio de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C (Log UFC/mL) pelo método Petrifilm™ HS frente ao método convencional e sistema Petrifilm™ EC e CC em amostras de leite pasteurizado.....130

Tabela 2. Contagens médias em log₁₀ UFC/mL de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C através do sistema Petrifilm™ HS, EC, CC e método convencional em amostras de leite pasteurizado.....130

Tabela 3. Tempo (em horas) para o resultado final do ensaio de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C pelo sistema Petrifilm™ HS, EC e CC e pela metodologia convencional.....131

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
CAPÍTULO 1	26
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
1.1. LEITE: CONCEITO E COMPOSIÇÃO	29
1.2. PRODUÇÃO DO LEITE NO BRASIL.....	29
1.3. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE	31
1.4. MICROBIOTA CONTAMINANTE DO LEITE.....	33
1.4.1. MICRORGANISMOS INDICADORES	34
1.4.1.1. MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS	34
1.4.1.2. BACTÉRIAS AERÓBIAS PSICROTÓFICAS	34
1.4.1.3. FAMÍLIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	35
1.4.1.4. GRUPO COLIFORMES	36
1.4.2. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS	37
1.4.2.1. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	37
1.4.2.2. <i>SALMONELLA</i> SPP.....	38
1.4.2.3. <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7.....	39
1.5. TRATAMENTOS TÉRMICOS APLICADOS AO LEITE	41
1.5.1 PASTEURIZAÇÃO	41
1.5.2. ULTRAPASTEURIZAÇÃO	43
1.6. MÉTODOS DE DETECÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	44
1.6.1 MÉTODOS CONVENCIONAIS.....	45
1.6.2 MÉTODOS RÁPIDOS OU ALTERNATIVOS	46
1.6.2.1. SISTEMA VIDAS® (BIOMÉRIEUX S.A.).....	47
1.6.2.2. SISTEMA PETRIFILM™ (3M COMPANY, ST. PAUL, MN, EUA)	50
1.6.2.3. SISTEMA TEMPO® (BIOMÉRIEUX S.A.).....	54
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
CAPÍTULO 2.....	67

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PROVENIENTE DE LATICÍNIOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA - BRASIL EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO.....	67
RESUMO	69
ABSTRACT.....	70
1. INTRODUÇÃO.....	70
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1. AMOSTRAS	71
2.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	72
2.2.1 MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS.....	72
2.2.2 ENTEROBACTÉRIAS	73
2.2.3 COLIFORMES A 35°C, COLIFORMES A 45°C E <i>ESCHERICHIA COLI</i>	73
2.2.4 CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS	74
2.2.5 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	74
2.2.6 <i>SALMONELLA</i> SPP.....	74
2.2.7 <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157H7	75
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	76
3. RESULTADOS	77
4. DISCUSSÃO.....	81
5. CONCLUSÃO	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
CAPÍTULO 3.....	89
AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ E SISTEMA TEMPO® NA CONTAGEM DE MICRORGANISMOS EM LEITE PASTEURIZADO.....	91
RESUMO	91
ABSTRACT.....	92
1. INTRODUÇÃO.....	92
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	93
2.1. AMOSTRAS	93
2.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	94
2.2.1 METODOLOGIA CONVENCIONAL	94
2.2.2 SISTEMA PETRIFILM™ (3M COMPANY, ST. PAUL, MN, EUA)...	95

2.2.3. SISTEMA TEMPO® (BIOMÉRIEUX S.A)	95
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	96
3. RESULTADOS.....	96
4. DISCUSSÃO.....	98
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
CAPÍTULO 4.....	107
AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ EB, TEMPO® EB COM O MÉTODO ISO 21528:2 PARA CONTAGEM DE <i>Enterobacteriaceae</i> EM LEITE	109
RESUMO	109
ABSTRACT.....	110
1. INTRODUÇÃO	110
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	112
2.1. AMOSTRAS DE LEITE	112
2.2. CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	112
2.3. ANÁLISES	113
2.4. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	113
2.4.1. MÉTODO ISO 21528:2.....	113
2.4.2. SISTEMA PETRIFILM™	114
2.4.3. SISTEMA TEMPO®	114
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	114
3. RESULTADOS.....	115
4. DISCUSSÃO.....	117
5. AGRADECIMENTOS.....	119
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
CAPÍTULO 5.....	123
AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ HS NA CONTAGEM DE COLIFORMES EM LEITE PASTEURIZADO	125
RESUMO	125
ABSTRACT.....	126
1 INTRODUÇÃO.....	126
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	128
2.1. AMOSTRAS.....	128

2.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	128
2.2.1 SISTEMA PETRIFILM™ (3M COMPANY, ST. PAUL, MN, EUA).	128
2.2.2 METODOLOGIA CONVENCIONAL	129
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	129
3. RESULTADOS	129
4. DISCUSSÃO.....	131
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
CONCLUSÃO GERAL	136
ANEXO.....	139

INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior produtor mundial de leite, excedendo 31 bilhões de litros anualmente (FAO, 2012), o que evidencia a importância da atividade leiteira para a economia brasileira, tanto no desempenho econômico como na geração de empregos permanentes. Neste cenário, Santa Catarina destaca-se como um dos estados em que ocorreram os maiores incrementos do volume de leite produzido em 2010 (ZOCCAL, 2012a).

O leite é um dos alimentos mais utilizados pela população devido a sua riqueza de nutrientes. No entanto, devido a sua composição química, alta atividade de água e pH próximo ao neutro torna-se susceptível a multiplicação de um grande número de microrganismos (GARRIDO et al., 2001; DOYLE; BEUCHAT, 2007).

Desta forma, a qualidade do leite é uma constante preocupação para técnicos e autoridades ligadas à área de saúde, principalmente pelo risco de veiculação de microrganismos relacionados com surtos de doenças de origem alimentar (TIMM et al., 2003; SILVA, M. et al., 2008). No Brasil, a atividade leiteira é caracterizada como típica de pequenos produtores, com pouco investimento na atividade resultando em uma produção leiteira de baixa qualidade, com altas contagens microbianas (NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009).

O ensaio microbiológico é uma ferramenta para verificar critérios microbiológicos ou avaliar o desempenho das estratégias de gestão baseadas em Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (JASSON et al., 2010). No entanto, para análise de microrganismos no leite e em outros alimentos, os métodos microbiológicos tradicionais demandam grande quantidade de material, excessivo trabalho, além de longo tempo para emitir os resultados, de modo que, visando solucionar este problema, na década de 90 e início dos anos 2000, vários métodos alternativos têm sido desenvolvidos com o objetivo de simplificar o processo e permitir a emissão de resultados com maior rapidez (VASAVADA, 1993; TAVOLARO et al., 2005).

Porém, variações regionais da microbiota ou da matriz alimentícia ou algumas características intrínsecas do alimento podem influenciar o desempenho dos métodos alternativos (TAVOLARO et al., 2005; CASAROTTI; PAULA; ROSSI, 2007). Beloti et al. (2002) destacam que a microbiota do leite pasteurizado produzido em

diferentes regiões do Brasil pode influenciar significativamente no desempenho de alguns métodos alternativos.

Diante deste contexto, é de extrema relevância investigar a qualidade microbiológica do leite produzido no estado de Santa Catarina, uma vez que estes dados poderão servir para elaboração de avaliações de risco e de apoio para estabelecimentos de políticas de controle de possíveis enfermidades causadas pelo consumo de leite contaminado, bem como para melhoria dos processos implicados na obtenção do leite cru e processado. Além de avaliar o comportamento dos métodos alternativos frente aos métodos convencionais nos ensaios microbiológicos com leite pasteurizado produzido no Estado de Santa Catarina.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliação da qualidade microbiológica do leite cru, pasteurizado e UHT de laticínios do estado de Santa Catarina e o desempenho de métodos alternativos para contagem e detecção microbiológica em leite pasteurizado.

Objetivos Específicos

- Apresentar uma revisão bibliográfica a respeito dos principais temas abordados na pesquisa (primeiro capítulo);

- Avaliar a qualidade microbiológica do leite cru de laticínios do estado de Santa Catarina em diferentes épocas do ano através da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos e *Staphylococcus aureus* (segundo capítulo);

- Avaliar a qualidade microbiológica do leite pasteurizado de laticínios do estado de Santa Catarina em diferentes épocas do ano através da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos, *Enterobacteriaceae*, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp e *Escherichia coli* O157 (segundo capítulo);

- Avaliar a qualidade microbiológica do leite UHT de laticínios do estado de Santa Catarina em diferentes estações do ano através da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e psicrotróficos (segundo capítulo);

-Comparar os resultados dos ensaios microbiológicos do sistema PetrifilmTM (3M Company, St. Paul, MN, EUA) para contagem microrganismos mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* com a metodologia convencional, em amostras de leite pasteurizado (terceiro capítulo);

-Comparar os resultados dos ensaios microbiológicos do sistema TEMPO[®] (Biomérieux S.A.) para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C e *Escherichia coli* com a metodologia convencional, em amostras de leite pasteurizado (terceiro capítulo);

-Comparar os resultados dos ensaios microbiológicos do sistema PetrifilmTM (3M Company, St. Paul, MN, EUA) para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C e *Escherichia coli* com o sistema TEMPO[®] (Biomérieux S.A.), em amostras de leite pasteurizado (terceiro capítulo);

-Comparar o sistema PetrifilmTM EB (3M Company, St. Paul, MN, EUA) e o sistema TEMPO[®] EB (Biomérieux S.A.) com a metodologia convencional para contagem de *Enterobacteriaceae* na microflora do leite pasteurizado e em amostras de leite pasteurizado e UHT artificialmente contaminadas (quarto capítulo);

-Comparar o sistema PetrifilmTM HS com o sistema PetrifilmTM EC, CC e a metodologia convencional na contagem de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C em leite pasteurizado (quinto capítulo).

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Leite: conceito e composição

O leite é definido como o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Por outro lado, o leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002).

O leite é composto de 87,3% de água; 4,6% de lactose; 4,2 % de gordura; 3,25% de proteína e 0,65% de substâncias minerais. No entanto, existe uma série de fatores que podem influenciar na composição do leite como a raça e idade do animal, a alimentação, período de lactação (ICMSF, 2005).

A gordura do leite é formada por triglicerídeos (97 a 98%), pequenas quantidades de esteróis, ácidos graxos livres e fosfolípidios, que contribuem para melhorar a palatabilidade do leite. As proteínas do leite são divididas em caseínas (α_1 , α_2 , β , γ e κ) e proteínas do soro (albumina do soro, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas e proteose-peptonas) e possuem uma elevada qualidade devido a diversidade de aminoácidos essenciais (TRONCO, 2010).

O leite possui um dissacarídeo, a lactose, que ajuda a aumentar a absorção do cálcio no organismo pela diminuição do pH intestinal. Também contém vários minerais e vitaminas, necessários à nutrição, sendo uma ótima fonte de cálcio e fósforo que são indispensáveis na formação e na manutenção dos ossos e dentes. (TRONCO, 2010).

1.2 Produção do leite no Brasil

O agronegócio do leite é considerado um dos setores mais importantes para a economia brasileira. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2012) a produção mundial de leite, em 2010, chegou a mais de 599 bilhões de litros. De acordo com a organização, os Estados Unidos lideram o ranking de países produtores (Tabela 1) com mais de 87 bilhões de litros produzidos, seguido pela Índia, com uma produção de 50 bilhões. O Brasil aparece como o quinto maior produtor com mais de 31 bilhões de litros.

Tabela 1 - Maiores países produtores de leite no mundo

Posição	País	Produção anual (bilhões de litros)
1º	Estados Unidos	87,46
2º	Índia	50,30
3º	China	36,03
4º	Rússia	31,89
5º	Brasil	31,66
6º	Alemanha	29,62
7º	França	23,30
8º	Nova Zelândia	17,01
9º	Reino Unido	13,96
10º	Turquia	12,48

Fonte: FAO, 2012

Detalhando a produção de leite no Brasil em cada estado, foi observado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) que Minas Gerais destaca-se como o estado de maior produção no ano de 2010, sendo responsável por 8,38 bilhões de litros de leite produzidos. Em seguida, tem-se o Rio Grande do Sul com 3,63 bilhões de litros; Paraná com 3,59 bilhões de litros; Goiás com 3,19 bilhões de litros e, ocupando a quinta posição, o estado de Santa Catarina, com 2,38 bilhões de litros produzidos (IBGE, 2010). Na Figura 1, pode se observar microrregiões do Brasil classificadas de acordo com a produção de leite.

Figura 1 – Distribuição geográfica de microrregiões produtoras de leite no Brasil, 2010



Fonte: ZOCCAL (2012a)

A produtividade de leite no Brasil cresceu 12% no período de 2005 a 2010. A maior produtividade de leite foi na Região Sul do País, sendo Santa Catarina o estado com a maior produtividade (2.432 litros/vaca/ano) (IBGE, 2010). A região de maior produtividade de acordo com a Embrapa é a região do oeste catarinense com uma produção de 1742 milhões de litros de leite. Merece ênfase a cidade de Chapecó com uma produção de 638 milhões de litros de leite (ZOCCAL, 2012b).

1.3. Qualidade microbiológica do leite no Brasil

A atividade leiteira vem se tornando cada vez mais importante para a economia brasileira, embora ainda seja caracterizada como típica de pequenos produtores com baixa produtividade. Devido a este perfil, tem-se pouco investimento na atividade resultando em uma produção leiteira de baixa qualidade, com altas contagens microbianas (NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009).

Trabalhos realizados com leite em várias regiões do país têm revelado elevadas contagens de aeróbios mesófilos, Coliformes, *Escherichia coli* e também *Staphylococcus* (COSTA; FERREIRA; ALVES, 2002; NERO et al., 2005a; ARCURI et al., 2006; MARTINS et al., 2008; TEBALDI et al., 2008, MATTOS et al., 2010).

Outro grupo de microrganismo que tem sido relatado em estudos no Brasil são os microrganismos psicrotróficos, os quais são produtores de enzimas termoestáveis que comprometem a qualidade dos produtos lácteos (MORAES et al., 2005; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

Além dos problemas em relação ao leite cru, muitas vezes, observa-se um beneficiamento ineficiente, sem a redução satisfatória dos microrganismos deteriorantes e patogênicos ou ainda a contaminação após o processo de pasteurização, que resultam em baixa qualidade do produto final (COSTA; FERREIRA; ALVES, 2002; TAMANINI et al., 2007).

Conforme salientam Silva et al. (2008), a presença de microrganismos no leite indica condições sanitárias inadequadas de processamento, que pode levar à deterioração e à perda de qualidade, com consequente perigo à saúde humana caso confirme a presença de linhagens patogênicas.

Buscando melhorar a qualidade do leite e seus derivados, em 1998, o Brasil criou um grupo de trabalho para analisar e propor programas e medidas visando ao aumento da competitividade e à modernização do setor produtivo de leite e derivados, através da Portaria 166 (BRASIL, 1998). Este grupo, formado por técnicos do governo e representantes de diversos setores ligados à cadeia do leite, elaborou o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), que culminou, em 1999, na publicação da Portaria 56 (BRASIL, 1999).

Após longos debates, a versão definitiva das novas normas de produção leiteira foi publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em setembro de 2002, a Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002). Em 2011 esta Instrução foi revisada culminando na Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011), que aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel e não permitindo mais a produção e comercialização do leite Tipo B (BRASIL, 2011).

Juntamente à iniciativa do governo por meio do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, algumas indústrias iniciaram a adoção de pagamento do leite baseado no volume e em

indicadores de qualidade. Neste contexto, a indústria tem papel fundamental, pois a partir do momento que adota programas de pagamento do leite baseado em indicadores de qualidade, proporciona maior lucro para os produtores de leite que buscam profissionalizar-se e, consequentemente, atendem os limites estabelecidos na IN 62 (SOUZA et al., 2010).

1.4. Microbiota contaminante do leite

O leite constitui uma significativa fonte alimentar para o homem devido a sua riqueza de nutrientes. Porém, o leite também é considerado excelente meio de cultura para o desenvolvimento de um grande número de microrganismos, que, ali, podem encontrar condições de multiplicação (TIMM et al., 2003; ZOCHE et al., 2002). O conhecimento dos principais microrganismos relacionados ao leite e derivados é de grande relevância para a Saúde Pública, de forma que, a partir desses dados, torna-se possível a criação de políticas de controle de enfermidades causadas por esses microrganismos. E, além disso, viabiliza o início do desenvolvimento de avaliações de risco, considerando os principais patógenos relacionados a esse produto e seus derivados, a população consumidora e as possíveis enfermidades decorrentes do consumo desses produtos (NERO, 2005b).

Quando o leite é proveniente de animais sadios o número de microrganismos é baixo, sendo predominante bactérias gram-positivas como *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* spp. Se o animal estiver com mastite, há o aumento da contagem de microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* associados com mastite contagiosa, enquanto Coliformes, *Pseudomonas* e outros *Streptococcus* spp são relacionados à mastite ambiental (APHA, 2001).

Desde o momento da saída do úbere, o leite fica exposto a contaminações, que podem ser da ordenha (principalmente se for manual), de correntes de ar, da água utilizada para limpeza dos utensílios, de máquinas, utensílios de coleta e armazenamento e, além disso, poderiam somar-se as contaminações que ocorrem durante o transporte de matéria prima, as contaminações no âmbito da indústria processadora, durante a distribuição do produto, sua estocagem no mercado até a chegada ao consumidor (ORDÓÑEZ et al., 2005; ICMSF, 2005).

A limpeza inadequada de equipamentos na indústria pode também levar a formação de biofilmes. Microrganismos como

micrococos, enterococos, aeróbios formadores de esporos e certos lactobacilos são incorporados no biofilme, multiplicam-se e são protegidos contra os efeitos de soluções de detergente e desinfetante tornando-se uma fonte de contaminação (ICMSF, 2005).

1.4.1. Microrganismos Indicadores

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando estão presentes no alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

1.4.1.1. Microrganismos mesófilos aeróbios

Os microrganismos mesófilos aeróbios podem avaliar a qualidade sanitária e a adesão a boas práticas de fabricação, no entanto, são pobres indicadores de segurança, uma vez que não estão diretamente relacionados à presença de patógenos ou toxinas (APHA, 2001). Esse grupo é muito importante, por incluir a maioria dos contaminantes do leite, tanto deterioradores como patogênicos (JAY, 1996).

A contagem de microrganismos mesófilos pode aumentar significativamente quando o leite entra em contato com equipamento e/ou utensílios de ordenha, ou no próprio tanque de refrigeração, os quais não foram higienizados corretamente, ou principalmente, pela ausência de uma refrigeração adequada. (GUERREIRO et al., 2005; COSTA, 2006).

1.4.1.2. Bactérias aeróbias psicrotróficas

Os psicrotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que crescem a temperatura de 0 a 7°C, mas com temperatura ótima acima de 20 °C, visíveis com sete a 10 dias, sendo extremamente importantes em produtos conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos longos (um a quatro semanas) (APHA, 2001; WEHR; FRANK, 2004).

A refrigeração do leite torna possível a multiplicação de microrganismos psicrotróficos, que incluem espécies como

Pseudomonas, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* e alguns coliformes, algumas espécies gram positivas como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterococcus* e *Arthrobacter* (APHA, 2001).

As fontes de contaminação de psicrotróficos no leite cru abrangem equipamentos da ordenha, utensílios e tanques de estocagem. No caso do leite pasteurizado, a contaminação ocorre por equipamentos e pelo ar (DOYLE; BEUCHAT, 2007).

A maioria dos psicrotróficos são termolábeis, porém algumas bactérias produzem proteases e lipases que são termorresistentes, as quais podem manifestar modificações sensoriais nos produtos lácteos. Na microbiota do leite, pode haver também formas esporuladas, principalmente dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, as quais são resistentes à pasteurização, estes podem comprometer a qualidade e a vida de prateleira do leite pasteurizado e seus derivados (ORDÓÑEZ et al., 2005).

1.4.1.3. Família Enterobacteriaceae

Estão incluídos, na família *Enterobacteriaceae*, gêneros como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*. A família *Enterobacteriaceae* é usada, como indicador de qualidade microbiológica e como índice de segurança dos alimentos na Europa. Recomenda-se o ensaio de enterobactérias ao invés de enumerar apenas Coliformes como indicador da qualidade do alimento, na tentativa de avaliar melhor microrganismos glicose positiva e membros da lactose negativa, como, por exemplo, a *Salmonella* da microbiota dos alimentos (APHA, 2001).

As enterobactérias são bactérias anaeróbias facultativas, cepas Gram-negativas, fermentam a glicose em ácido, são oxidase negativa, usualmente catalase positiva, normalmente reduzem nitrato e podem ou não ser móveis (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Diversas espécies de Enterobactérias são responsáveis por doenças infecciosas que podem apresentar caráter endêmico, assim como, do ponto de vista tecnológico, pois fermentam os açúcares, com formação de gases e ácidos, ocasionando fermentações, acidificação, estufamento entre outros (TRONCO, 2010).

1.4.1.4. Grupo Coliformes

Os Coliformes a 35 °C ou Coliformes totais são compostos por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, apresentam a capacidade de fermentar a lactose, produzindo ácido e gás a 32 °C ou 35 °C. Pertencem a este grupo os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*. Destes, só a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e dos animais. Já *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo (APHA, 2001).

Os Coliformes a 45 °C ou Coliformes fecais correspondem às Coliformes totais que são capazes de fermentar a lactose com produção de gás a 44 – 45,5 °C fornecem, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos. As definições utilizadas para Coliformes a 35 °C e Coliformes a 45 °C são descritas como conceitos de trabalho uma vez que estes grupos não têm validade taxonômica (APHA, 2001; WEHR; FRANK, 2004; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Acrescente-se, neste ponto, que bactérias deste grupo são sensíveis a pasteurização e sua presença em produtos tratados termicamente indicam contaminação após processo (TAMANINI et al., 2007).

A *Escherichia coli* pertence à família das Enterobactérias, tem como características a produção de indol e da enzima β -glicoronidase em 96% das cepas. O metabolismo fermentativo da glicose resulta em uma quantidade significativa de ácidos (ácido lático, acético e fórmico). Essa característica é evidenciada no teste positivo de vermelho de metila (VM), que verifica se o pH final do meio de cultura atinge valores abaixo de 4,5. Consequentemente, o teste de Voges Proskauer (VP), que verifica a produção de butilenoglicol como produto final de fermentação da glicose, é negativo para *E. coli*. Outra característica a salientar do metabolismo fermentativo é a capacidade de hidrolizar parte do ácido fórmico produzido, resultando em dióxido de carbono e hidrogênio (produção de gás) (SILVA, 2004).

A *Escherichia coli* é um componente normal da flora intestinal do homem e de animais de sangue quente, usualmente continua inofensiva quando confinada ao lúmen intestinal, no entanto, em pessoas debilitadas ou imunossuprimidas ou ainda quando as barreiras gastrointestinais são violadas, linhagens de *E. coli* não patogênicas podem causar infecções (FORSYTHE, 2002). No entanto, várias cepas

adquiriram atributos de virulência específicos que lhes permitem causar uma variedade de doenças (DOYLE; BEUCHAT, 2007).

A *Escherichia coli* é diferenciada sorologicamente baseada em três antígenos, (O) antígenos somáticos, polissacarídeo termooestável; (H) antígenos flagelares, relacionados com proteínas do flagelo, é termolábil e ainda, antígenos (K), relacionados com polissacarídeos capsulares. Foram, até o momento, descritos 173 antígenos O, 56 H e 103 K diferentes (ACHA; SZYFRES, 2003; DOYLE; BEUCHAT, 2007).

Com base no fator de virulência, há seis grupos de *E. coli* patogênicas reconhecidos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC ou EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) (DOYLE; BEUCHAT, 2007).

1.4.2. Microrganismos patogênicos

Microrganismos causadores de doenças podem contaminar o leite através de animais infectados, pelo ordenhador ou através do ambiente. O consumo de leite tem implicado em surtos envolvendo *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolítica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium botulinum* (APHA, 2001; CHEY; ABDULLAH; AYOB, 2004).

Dentre estes, destacam-se alguns microrganismos de interesse:

1.4.2.1. *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são bactérias gram-positivas, imóveis, de forma esférica, medindo de 0,5 a 1,0 µm, agrupados em massas irregulares em forma de “cacho”. Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbios e anaeróbios facultativos. Podem crescer em temperaturas de sete a 48 °C, com um ótimo de 30 a 37 °C (HOLT et al., 1994).

A intoxicação alimentar provocada por *Staphylococcus aureus* decorre da ingestão de enterotoxinas (SE) produzidas e liberadas pela bactéria durante a sua multiplicação no alimento. A presença de toxina só é encontrada em níveis de 10⁶ *Staphylococcus aureus*/g do produto. As enterotoxinas (SE), fatores de virulência, são proteínas simples, termotolerantes, tradicionalmente são cinco tipos clássicos associadas a surtos SEA, SEB, SEC, SED e SEE, contudo, 13 novos tipos de toxinas

e sua implicação na saúde pública ainda não estão totalmente elucidados (APHA, 2001; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002; WEILER et al., 2011).

O *Staphylococcus aureus* é amplamente distribuído na natureza, mas o homem e os animais são os principais reservatórios. Ele está presente nas vias nasais e na garganta, no cabelo e na pele de 50% ou mais dos indivíduos saudáveis. Apesar dos manipuladores de alimentos serem as principais fontes de contaminação, os equipamentos e as superfícies também podem ser a fonte das contaminações por *Staphylococcus aureus* (FORSYTHE, 2002). Outra forma de contaminação é através dos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite, uma vez que esse microrganismo é um dos principais agentes causadores da mastite bovina. Em casos de mastite sub-clínica, caracterizada por não haver alterações visíveis no leite e no úbere são reportados níveis de 10^4 - 10^5 UFC/mL no leite, já quando o bovino apresenta a forma clínica, com visíveis alterações no leite associadas ou não a alterações no úbere, são reportados níveis de 10^8 UFC/mL no leite (ICMSF, 2005; KAULING, 2008).

O *Staphylococcus aureus* pode ser evitado utilizando-se tratamento térmico aos alimentos, mas pode ocorrer uma contaminação ou recontaminação pós-pasteurização se as condições de higiene são inadequadas. Os sintomas mais comuns da intoxicação provocada por *Staphylococcus aureus* são vômito e diarreia que se manifestam entre duas a seis horas após a ingestão da toxina (APHA, 2001; OBESO et al., 2010).

1.4.2.2. *Salmonella* spp

A *Salmonella* spp é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos, estima-se que 1,2 milhões de casos ocorrem anualmente nos Estados Unidos (CDC, 2012a). A *Salmonella* spp é um bacilo gram negativo, a maioria é móvel, com temperatura ótima de crescimento de 38 °C, produzem ácido e gás a partir de glicose, são oxidase negativa, catalase positiva, indol e Voges-Proskauer negativa, citrato Simmons e vermelho de metila positiva, lisina positiva, H₂S é produzido e ureia não é hidrolizada, sendo os principais reservatórios o trato intestinal do homem e dos animais (HOLT et al., 1994; FORSYTHE, 2002).

O gênero *Salmonella* possui duas espécies, a *S. enterica* e a *S. bongori*, cada uma delas contém vários sorovares. A *S. enterica* está dividida em seis subespécies (I, *S. enterica* subsp. Enterica; II, *S.*

enterica subsp. *Salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *Arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *Diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *Houtenae*; e VI, *S. enterica* subsp. *Indica* (DOYLE; BEUCHAT, 2007). O gênero contém cerca de 2.200 sorovares ou sorotipos. São diferenciáveis pelos seus antígenos de estrutura, (O) antígeno somático, (H) flagelar e (Vi) capsulares, adotando-se o esquema de Kaufmann-White (ACHA; SZYFRES, 2003).

As doenças transmitidas por alimentos causadas por *Salmonella* spp são frequentemente associadas à ingestão de carnes, aves, ovos, leite cru ou leite pasteurizado inadequadamente e derivados sem tratamento térmico (NERO, 2005b). O leite cru é um importante veículo de infecção de *Salmonella* spp para o homem. A *Salmonella* spp não resiste ao processo de pasteurização, no entanto, quando é encontrada deve-se a um tratamento térmico impróprio ou à contaminação pós-pasteurização (ICMSF, 2005).

A contaminação do leite pode dar-se por uma variedade de rotas. Os bovinos podem, ocasionalmente, durante a fase febril de salmonelose excretar o microrganismo no seu leite ou, mais comumente, as fezes infectadas tanto de casos clínicos ou de portador saudável podem contaminar o leite durante o processo de ordenha. O leite também pode sofrer uma contaminação indireta, pelo uso de água poluída ou equipamentos sujos durante a ordenha. Muitos dos surtos de salmonelose humana têm sido associados com o consumo de matérias primas do leite (WRAY; WRAY, 2000).

Em um estudo desenvolvido no Estado do Rio Grande do Sul por Welker et al. (2010), *Salmonella* spp representou 25% dos microrganismos identificados em alimentos envolvidos em surtos de DTA no período de 2006 a 2007, e os produtos lácteos representaram 8% dos alimentos envolvidos. Em outro estudo realizado por Padilha et al. (2001) que analisaram 250 amostras de leite pasteurizado tipo C e 50 amostras de leite cru na cidade do Recife, detectou-se uma amostra positiva no leite pasteurizado tipo C e uma positiva no leite cru.

As doenças causadas por *Salmonella* são divididas em febre tifóide causada por *Salmonella typhi* as febres entéricas, causadas por *Salmonella paratyphi* e as enterocolites (ou salmoneloses), pelas demais salmonelas (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

1.4.2.3. *Escherichia coli* O157:H7

A *Escherichia coli* O157:H7 foi identificada, pela primeira vez, como um agente patogênico no homem em 1982. Pertence a um grupo de cepas patogênicas da *Escherichia coli*, conhecidas como

enterohemorrágicas (EHEC) ou produtoras de verotoxina (VTEC) ou também *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Essas linhagens caracterizam-se pela produção de uma toxina chamada de verotoxina (VT) ou *shiga-like* toxina (STX), similar a produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I. A *Escherichia coli* O157:H7 pode causar diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica (TTP) (SANDRINI et al., 2007; SARIMEHMETOGLU et al., 2009; KARMAI; GANNON; SARGEANT, 2010).

A capacidade da *E. coli* O157: H7 causar doença está associada à produção de toxinas potentes. Os principais fatores de virulência são os genes da toxina Shiga chamados de *stx1* e *stx2*. Possui também o gene *eae*, responsável pelo efeito de aderência A/E *attaching and effacing* nas células por codificação da proteína intimina, o gene *hly*, que possui atividade hemolítica e um plasmídeo chamado pO157 de, aproximadamente, 60 MDa (megadaltons), implicado a patogenia da infecção (LAW, 2000; ATEBA; MBEWE, 2011).

A *E. coli* O157:H7 apresenta algumas características que a distinguem das demais cepas de *E. coli* como o crescimento pobre ou nulo a 44°C a incapacidade de utilizar o sorbitol e, além de não produzir a enzima β -glucuronidase (FORSYTHE, 2002). Desta forma, a *E. coli* O157:H7 não é detectada nas análises de coliformes fecais pelo método do número mais provável (NMP), que usa a fermentação da lactose a 44,5°C como característica confirmativa e também nas análises diretas de *E.coli* utilizando substratos para a enzima β -glucuronidase (SILVA et al., 2003).

O principal reservatório da *E. Coli* O157:H7 parece ser o trato intestinal de bovinos, mas também tem sido isoladas em outros ruminantes como ovinos, caprinos e, esporadicamente, em frangos, suínos e cachorros (SILVA et al., 2001; AL-GALLAS et al., 2002; ATEBA; BEZUIDENHOUT, 2008). Como agente de doenças transmitidas por alimentos tem sido, especialmente, associada ao consumo de carne bovina mal cozida, de leite não pasteurizado e de águas de abastecimento e recreação contaminadas pelo conteúdo intestinal de animais (SANDRINI et al., 2007).

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), entre os anos de 2000 e 2009, foram confirmados, nos EUA, 247 surtos de doenças transmitidas por alimentares causados pela *Escherichia coli* O157:H7 envolvendo a ingestão de leite ou produtos lácteos (CDC, 2012b). De acordo com Garcia et al. (2008) ainda não há nenhum relato da ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em leite pasteurizado e

derivados no Brasil. Na região de Pelotas – RS no ano de 1999 e 2000, Sandrini et al. (2007) isolaram VTEC em 5% (3/60) amostras de leite cru. Em um estudo desenvolvido por Rassoly e Do (2010), demonstrou-se a importância da investigação da *Escherichia coli* O157:H7 em leite pasteurizado. Eles relataram que a toxina Shiga 2 (*Stx2*), um dos fatores de virulência da *E. Coli* O157:H7, é estável ao calor e à pasteurização do leite a diferentes temperaturas e tempos sugeridos pelo FDA (63 °C por 30 min, ou 72 °C por 15 s ou 89 °C por 1 s), não reduzindo a atividade biológica do gene *Stx2*. Apenas sendo inativado a tratamento de 100 °C por 5 min, demonstrando desta forma, que o gene *Stx2* não é inativado pela pasteurização convencional.

1.5. Tratamentos térmicos aplicados ao leite

O leite, por suas características físicas, químicas e biológicas, torna-se um produto altamente perecível e, desse modo, pode ser um veículo de doenças caso não haja um conjunto de ações preventivas antes de seu consumo (MENDES; SILVA; ABRANTES, 2009).

Os processos de aquecimento são os mais amplamente utilizados no âmbito industrial, podendo variar conforme os diferentes valores do binômio tempo/temperatura. A escolha do tipo de tratamento térmico deve considerar a natureza do produto a elaborar, o grau de destruição bacteriana que se deseja alcançar, bem como o tipo de alteração que pode efetuar-se com os componentes do leite (TRONCO, 2010).

O processo do tratamento térmico foi ajustado há anos, de acordo com os parâmetros térmicos de algumas bactérias patogênicas mais termorresistentes, a *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetii* e *Listeria monocytogenes*, desta forma, os tratamentos térmicos garantiriam a saúde do consumidor (ORDONEZ, 2005; TRONCO, 2010)

Dentre os tratamentos térmicos, os mais empregados pelas indústrias de laticínios são a pasteurização e a esterilização.

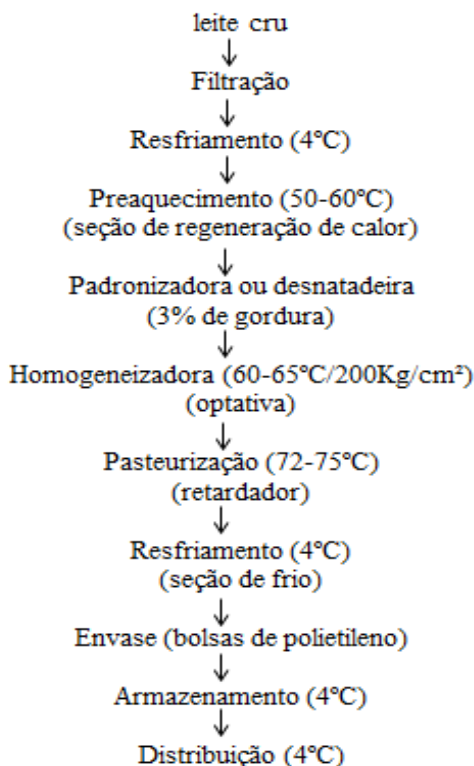
1.5.1 Pasteurização

A pasteurização tem como objetivo minimizar os riscos de veiculação de patogênicos, assim como prolongar a vida de prateleira dos produtos (EVANGELISTA, 2008). Como destacam Tamanini et al. (2007), a pasteurização é considerada um ponto crítico quando se realiza Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), visto que

não há nenhum tratamento posterior que elimine os perigos microbiológicos incorporados.

De acordo com a IN 62 (BRASIL, 2011) o leite pasteurizado deve ser submetido a tratamento térmico na faixa de temperatura de 72 a 75°C durante 15 a 20 segundos, em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termo-registrador e termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se de resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4°C e após envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações. Este processo é chamado de pasteurização rápida (“High Temperature Short Time” – HTST). Na figura 2 segue o fluxograma da pasteurização rápida.

Figura 2 - Fluxograma da Pasteurização rápida



A pasteurização é suficiente para destruir, inclusive, os microrganismos de maior resistência térmica como *Mycobacterium* spp. e *Coxiella burnetti*, além de todas as leveduras, bolores, bactérias gram negativo e muitas gram positivos, os microrganismos sobreviventes são os termófilos (*Bacillus* e *Clostridium*) e os termodúricos (*Streptococcus* e *Lactobacillus*) (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

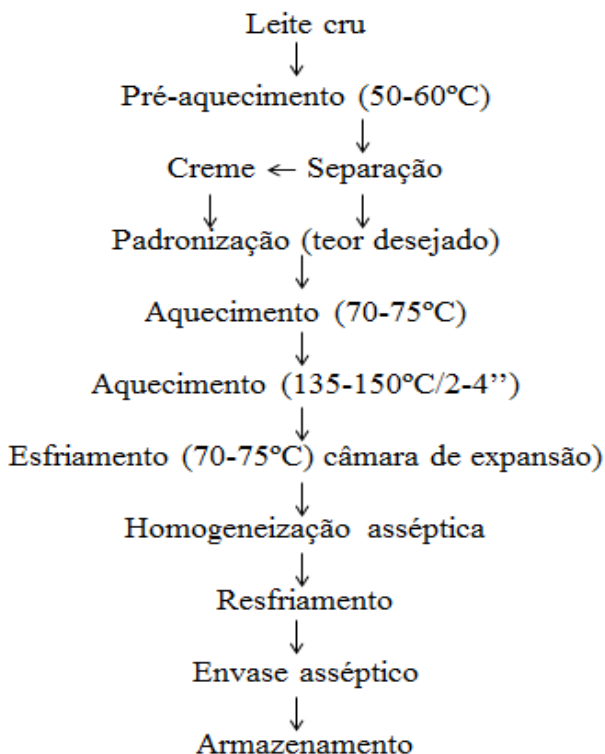
1.5.2. Ultrapasteurização

A ultrapasteurização é conhecida como UHT (“Ultra High Temperature”) tem como objetivo a eliminação da maior parte dos microrganismos em sua forma vegetativa, porém alguns microrganismos em sua forma esporulada podem sobreviver (SCHOCKEN-ITURRINO et al. 1996).

De acordo com a Portaria 146 (BRASIL, 1996) entende-se por leite UHT (Ultra-Alta Temperatura, UAT) o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

De acordo com o método de aquecimento, os sistemas de processamento UHT podem ser classificados em dois tipos: método de aquecimento direto (por injeção de vapor e/ou o leite é pulverizado no vapor) e indireto (o agente térmico não se mistura com o leite) (TRONCO, 2010). Na Figura 3, estão dispostas as etapas, no fluxograma básico do processo UHT.

Figura 3 - Fluxograma do processo UHT



Fonte: TRONCO, 2010

Técnica alternativa está sendo aplicada para a produção do leite UHT, o sistema Ultra Fresh™ ou **bactofugação**, o leite pré-aquecido é submetido a um tratamento físico e hermético de centrifugação, para a remoção dos microrganismos. Assim, retorna à área de aquecimento de injeção de vapor, onde é tratado termicamente a temperatura de 138°C, por alguns segundos, para eliminação dos microrganismos remanescentes. Em seguida, o leite é homogeneizado e resfriado a temperatura ambiente, e, depois, envasado (TETRA PAK, 2012).

1.6. Métodos de detecção microbiológica

As doenças transmitidas por alimento (DTA) são um dos problemas mais sérios de saúde pública (WHO, 2009). Com o propósito

de reduzir riscos de contaminação ao consumidor programas de controle de qualidade microbiológica estão sendo aplicados em toda a cadeia de produção alimentar (MALORNY et al., 2003). O ensaio microbiológico vem sendo adotado já há um longo tempo como uma forma de controle e monitoramento da matéria prima e do produto industrializado, garantindo a segurança microbiológica do alimento e desta forma não oferecendo riscos à saúde do consumidor (NERO et al., 2000).

O controle microbiológico na indústria láctea tem uma importância muito grande, uma vez que o leite é um excelente meio de cultura para os microrganismos em virtude das suas características intrínsecas como a alta atividade de água, o pH próximo ao neutro e a variedade de nutrientes (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os métodos de detecção são frequentemente categorizados em dois grupos: convencionais e rápidos. Os termos são, no entanto, mal aplicados tendo em vista que alguns métodos rápidos necessitam de 24 horas para o resultado ser obtido (FORSYTHE, 2002).

1.6.1 Métodos Convencionais

As análises microbiológicas convencionais empregadas no controle de qualidade de alimentos foram desenvolvidas no final do século XIX e são usadas até hoje (SENYK et al., 1987).

Os métodos convencionais também são denominados como métodos tradicionais. Convencional diz respeito a procedimentos que estão em uso comum, envolvem homogeneização, diluições, inoculação em placas com ágar específicos para a formação de colônias e contagem. Muitas vezes, outras etapas também precisam ser realizadas para permitir que microrganismos lesados por tratamentos físicos e químicos recuperem-se e multipliquem até níveis detectáveis, como na detecção de *Salmonella*, em que a amostra passa por uma etapa de pré-enriquecimento, é incubada em água peptonada tamponada para permitir a sua recuperação (FORSYTHE, 2002).

Os métodos microbiológicos convencionais embora confiáveis e eficientes, exigem disponibilidade de tempo e grande trabalho laboratorial (MANORLY et al., 2003; SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Conforme salientam Reiter et al. (2010), embora as técnicas de análise convencionais tenham sua sensibilidade bem documentada, o tempo necessário para obter resultados é muitas vezes longo demais para as exigências da indústria.

Outro ponto discutido entre pesquisadores é a questão que muitos patógenos são capazes de entrar em um estado latente, em que as células não são cultiváveis, mas permanecem viáveis (VNC) provocado por inúmeros fatores extrínsecos. Os métodos usuais podem não estar recuperando estes patógenos e métodos alternativos poderiam ser desenvolvidos para detectar esse tipo de bactéria (FORSYTHE, 2002).

1.6.2 Métodos Rápidos ou Alternativos

Os métodos rápidos são alternativos aos convencionais e são projetados para obter o resultado final em menos tempo. Tais métodos são bastante desejáveis na indústria de alimentos, apesar das técnicas poderem ser mais caras e requererem pessoal com alto nível de treinamento (FORSYTHE, 2002).

Os métodos alternativos apresentam a vantagem de produzirem resultados mais rápidos, sensíveis (detectar amostra positiva, quando é conhecido positivo) e específicos (detectar a amostra negativa, quando é conhecido negativo), além de oferecer economia de espaço e materiais, aumentando a produtividade laboratorial quando comparados às técnicas convencionais (FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002; SANTANA; CONCEIÇÃO; AZEREDO, 2002).

Como destaca Franchin (2008), um tempo longo para a análise prolonga a tomada de ações corretivas e preventivas em casos de desvios de qualidade do processo, quando monitorados por análises microbiológicas. Em virtude disto, a busca de novos métodos, que reduzam o tempo para o resultado final, desde que comprovada sua eficácia, leva a solução de possíveis problemas de ordem microbiológica durante a produção de alimentos no nível industrial.

Quando um novo método é proposto, ele é avaliado através de um estudo colaborativo realizado por diversos laboratórios, que analisam o mesmo produto simultaneamente empregando a mesma metodologia. Nos Estados Unidos a avaliação é feita pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) em conjunto com a FDA (Food and Drug Administration), após o novo método ser numerado e publicado no “*Official Methods of Analysis*” da AOAC pode ser utilizado como oficial. Posição semelhante exerce a *Association Française de Normalisation* (AFNOR) na França (FRANCO, 1994; BOER; BEUMER, 1999).

Resultados das validações internacionais de métodos analíticos precisam ser interpretados com cautela, pois não levam em conta as variações regionais da microbiota dos alimentos (TAVOLARO et al.,

2005). De acordo com Nero, Belotti e Barros (2000), alguns cuidados devem ser observados na escolha de um método rápido, como a importância de conhecer-se o princípio ativo de cada método, a microbiota do alimento e os fatores que influenciam sua composição, tendo em vista que estes métodos foram baseados na microbiota típica de países, em que, as condições de produção, conservação e mesmo climáticas diferem das encontradas no Brasil. Neste sentido, Belotti et al. (2002) demonstraram que a microbiota autóctone de leite pasteurizado produzido em determinadas regiões brasileiras influenciou significativamente o desempenho de alguns métodos rápidos.

Jasson et al. (2010) apresentam em seu trabalho uma variedade de métodos microbiológicos alternativos. Em relação aos métodos quantitativos alternativos destacam meios cromogênicos, métodos modificados como PetrifilmTM (3MTM), Compact Dry (Nissui Pharmaceutical Co., LTD.), SimPlate[®] (BioControl systems), TEMPO[®] (Bio-Mérieux), Colilert[®] (IDEXX Laboratories), Soleris[®] (Neogen) além de outros métodos baseados na Microscopia (Citometria de fluxo e DEFT – Direct Epifluorescence Technique) e Bioquímica (Impedância e Bioluminescência). Em relação aos métodos qualitativos, apontam os imunoenaios (LFD - Lateral flow devices, ELISA – Enzym e linked immunosorbent assay e ELFA – enzyme linked fluorescent assays, Concentração e separação Imunomagnética), métodos de detecção baseados no bacteriófago, microscopicamente e molecular.

Numerosos métodos alternativos estão disponíveis visando melhorar a eficiência na determinação de microrganismos. Neste trabalho será dado um destaque especial para o Sistema VIDAS[®] (Biomérieux S.A.), Sistema de PetrifilmTM (3M Company, St. Paul, MN, EUA) e Sistema TEMPO[®] (Biomérieux S.A.).

1.6.2.1. Sistema VIDAS[®] (Biomérieux S.A.)

O sistema VIDAS[®] BioMérieux S.A. é um ensaio automatizado qualitativo para detecção de patógenos em alimentos, baseado no método ELISA. O miniVIDAS[®] (Figura 4) é uma versão compacta, apresenta-se dividido em dois compartimentos independentes, onde cada um possui seis canais que possibilitam a execução simultânea de seis testes, com capacidade total de 12 testes com execução simultânea (BOER; BEUMER, 1999; LIMA, 2005; REITER et al., 2010).

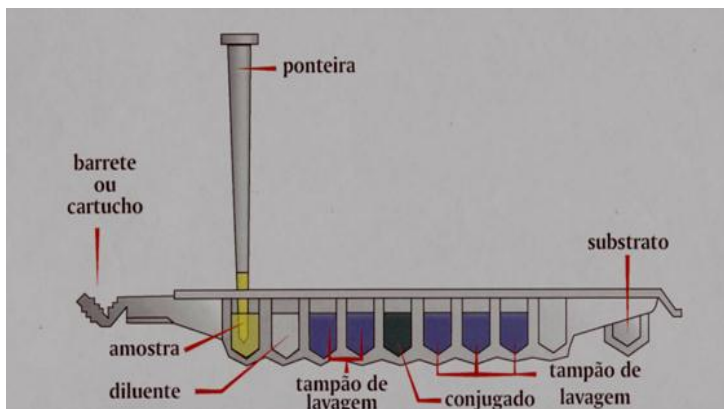
Figura 4 - Mini VIDAS® BioMérieux S.A



Fonte: JORGE, 2005

O sistema VIDAS® é um ensaio imunoenzimático que utiliza a técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*). É um teste simples, composto por galerias plásticas descartáveis (Figura 5), que contêm câmaras com os reagentes necessários para o teste e um cone (SPR – *Solid-phase receptacle*) revestido com anticorpos específicos. Após a adição da cultura enriquecida na primeira câmara, e a introdução da galeria no aparelho, todas as etapas do teste são executadas automaticamente, inclusive a leitura dos resultados (FRANCO, 1994; BOER; BEUMER, 1999).

Figura 5 - Barrete ® BioMérieux S.A

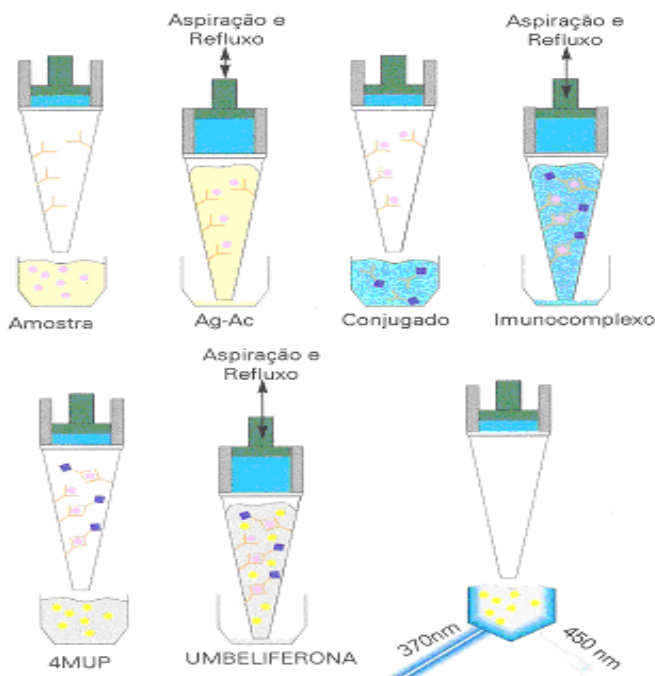


Fonte: JORGE, 2005

Uma fração das alíquotas do caldo enriquecido aquecido é colocada no barrete e a amostra é submetida a um ciclo de aspiração e

dispensação cuja duração foi especificamente calculada para ativar a reação. Os antígenos presentes no meio vão fixar-se aos anticorpos monoclonais específicos aderidos ao interior do cone. As etapas de lavagem eliminam os elementos não fixados. Em seguida, os anticorpos conjugados com a enzima fosfatase alcalina são aspirados e dispensados pelo cone, fixando-se aos antígenos específicos, que já se encontram aderidos aos anticorpos da parede do cone. Novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado. Na etapa final de revelação, o substrato 4 Metil umbeliferil fosfato (4 MUP) é aspirado e dispensado pelo cone. A enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato em 4-metil-umbeliferona, cuja fluorescência emitida é medida a 450nm (Figura 6) (AOAC, 2002).

Figura 6 - Esquema ELFA



Fonte: JORGE, 2005

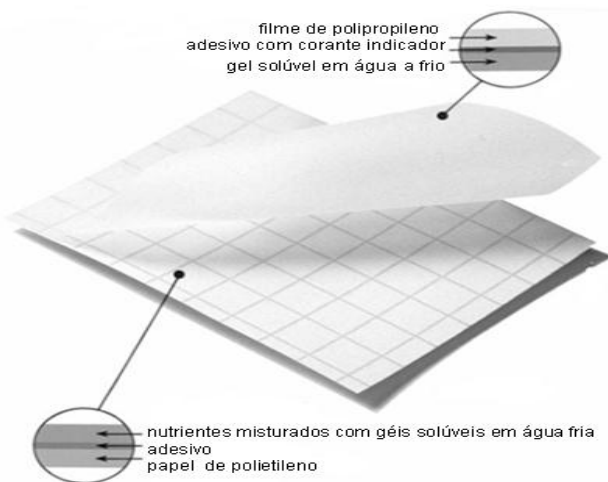
O sistema VIDAS® disponibiliza, no mercado, vários testes para identificação, na área de alimentos vidas *Salmonella*, *Listeria ssp*,

E.coli O157:H7, *Campylobacter* e enterotoxinas de *Staphylococcus*. A *Association Official Analytical Chemists* (AOAC) e a *Association Française de Normalisation* (AFNOR) reconhecem-no para identificação de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 (AFNOR VALIDATION, 2011; AOAC, 2002). O kit VIDAS® *Staph enterotoxin* (SET) para a detecção simultânea de enterotoxinas estafilocócicas é validado pela AOAC (*Association Official Analytical Chemists*) (AOAC INTERNATIONAL, 2011).

1.6.2.2. Sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA)

O sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA) é constituído por um sistema de filme duplo (Figura 7). O filme inferior é recoberto de nutrientes desidratados e géis hidrossolúveis a frio, enquanto, o filme superior contém agentes geleificantes e um corante indicador (JASSON et al., 2010; BELOTI et al., 2002).

Figura 7 - Placa de Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA)

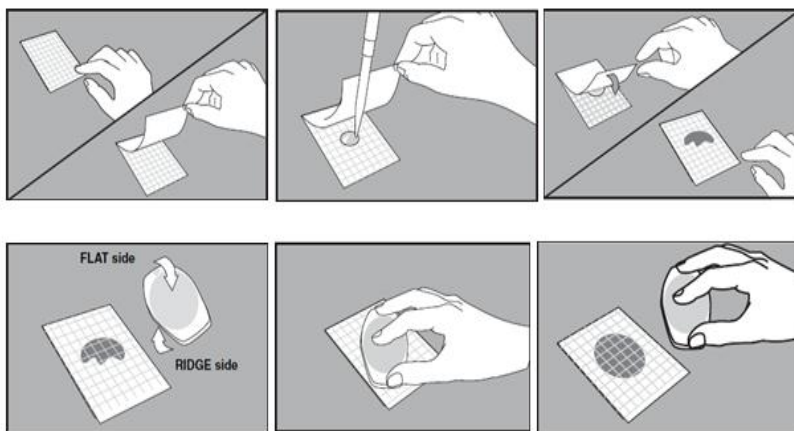


Fonte: FRANCO (1994)

Para realizar a inoculação da amostra, é necessário levantar o filme plástico superior da placa e colocar a amostra, diluída ou não, e voltar este filme para a sua posição original, em continuidade, aplicar um difusor plástico para distribuir a amostra uniformemente pela placa e aguardar a solidificação do gel (um minuto) (Figura 8). Após a

solidificação, deve-se incubar na temperatura e tempo indicados pelo fabricante. Decorrido o tempo de incubação, as colônias visíveis são enumeradas e o resultado é expresso em UFC/mL (NERO; BELOTTI; BARROS, 2000).

Figura 8 - Inoculação em Placa de PetrifilmTM (3M Company, St. Paul, MN, EUA)



Fonte: 3M DO BRASIL LTDA (2001)

O princípio de funcionamento das placas de PetrifilmTM é bastante simples, a água do inóculo reconstitui o meio de cultura desidratado e solubiliza os agentes geleificantes presentes na placa e na película plástica. Após o meio de cultura geleificar e as placas podem ser incubadas na posição horizontal e com a superfície transparente para cima. Em função dos corantes indicadores presentes no meio, as colônias que se desenvolvem são coloridas. Assim sendo, a contagem pode ser feita manualmente ou utilizando-se o contador de colônias (FRANCO, 1994).

Atualmente, são comercializadas placas PetrifilmTM para contagem total de bactérias aeróbias (AC) com leitura em 48 horas; Enterobactérias (EB), Coliformes (CC), Coliformes e *E. coli* simultaneamente (EC), todos com leitura em 24h contagem rápida de Coliforme (RCC), com resultado entre oito e 24 horas; Bolores e Leveduras (YM), com leitura em três a cinco dias; *Staphylococcus aureus* (RSA), com resultado em 22 horas; *Listeria ambiental* (EL), com resultado em 31 horas e *E. coli* O157.(Kit-HEC), resultados presuntivos em 26-28 horas. Também há as placas PetrifilmTM de Alta Sensibilidade

(HSCC), destinadas à contagem de Coliformes em 5ml de produto com resultado em 24 horas (3M™ Petrifilm™, 2011).

O Petrifilm™ AC para contagem de bactérias aeróbias totais é constituído de ágar padrão para contagem (PCA) e o corante indicador 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) que, quando reduzido pelas colônias em crescimento, confere-lhes a coloração vermelha. Ao adicionar a amostra, os nutrientes hidratam-se, o gel solidifica e a placa está pronta para ser incubada a 35-37°C por 48h (NERO; BELOTTI; BARROS, 2000; BELOTTI, 2002). As placas de Petrifilm™ AC são convencionalmente utilizadas para contagem de aeróbios mesófilos, mas também pode ser empregadas para a enumeração de bactérias ácido lácticas (ORTOLANI et al., 2007; NERO; BELOTTI; BARROS, 2000).

A placa de Petrifilm™ EB é uma alternativa rápida para a contagem padrão de enterobactérias, usando como meio de cultura o vermelho violeta bile glicose (VRBG) e o indicador tetrazólio (TTC). Com incubação a 35°C por 24h, são definidas como colônias vermelhas, com um halo amarelo (indicativo da produção de ácido) e associadas ou não com bolhas de gás (APHA, 2001).

As placas de contagem de coliformes possuem como meio de cultura base o ágar vermelho violeta bile (VRB), corante indicador 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e agentes geleificantes. A característica das placas de coliforme são colônias vermelhas pela redução do TTC e bolhas de gás associadas a estas colônias provocadas pela fermentação da lactose. As placas para contagem de coliformes são incubadas por 24h a 35°C, porém, para as colônias de *E. coli*, podem ser necessárias mais 24h para a identificação das colônias. A placa de Petrifilm™ EC, além dos componentes já citados presentes nas placas de coliformes, contém o 5 bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glicoronídeo (BCIG), que indica a atividade glicoronidásica da *E. coli*. Em torno de 97% das cepas de *E. coli* produzem a enzima glucuronidase que, ao degradar ao BCIG, libera o indicador que torna a colônia azul, junto com bolhas de gás produzidas pela fermentação da lactose (NERO; BELOTTI; BARROS, 2000).

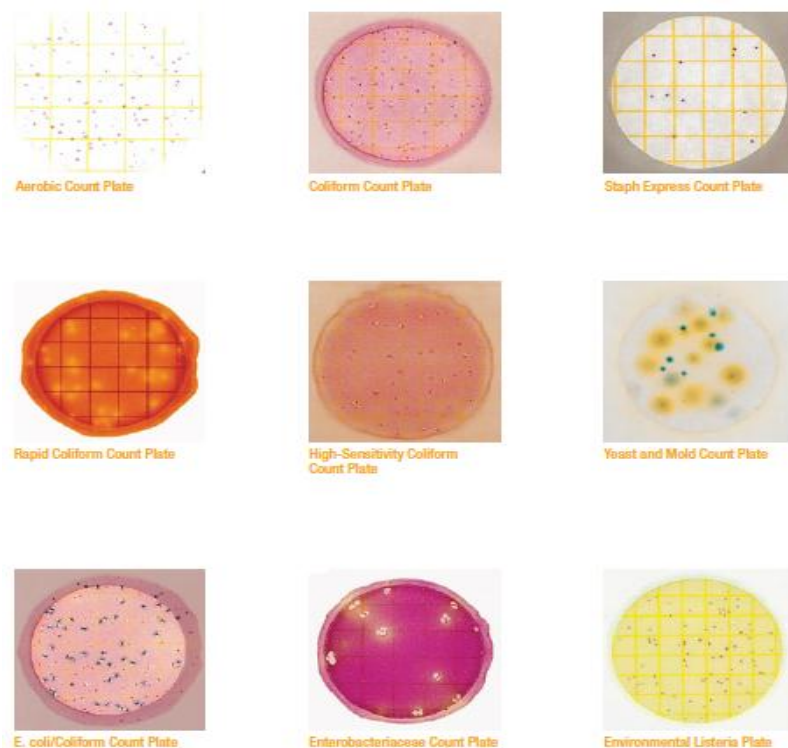
As placas de Petrifilm™ YM para contagem de bolores e leveduras contém ágar Sabouraud suplementado com glicose, antibióticos (clortetraciclina e cloranfenicol) e um indicador de atividade fosfatásica. Toda a célula viável produz fosfatase e, na presença dessa enzima, o indicador é ativado corando as colônias de bolores e leveduras de azul. São incubadas a 20°C e 25°C por cinco dias. As colônias de leveduras são pequenas, com coloração azul esverdeado, bordas definidas e sem foco. As colônias de bolores são grandes, com bordas

difusas, podendo apresentar diversas colorações além da azul, devido aos pigmentos naturais que podem produzir (pretas, amarelas, verdes) e focos centrais (FRANCO, 1994).

A placa de PetrifilmTM RSA possui nutrientes de Baird Parker modificado, sendo seletivo e diferencial para *Staphylococcus aureus*. A confirmação de *Staphylococcus aureus* é realizada por uma reação de termonuclease termoestável, efetivada por um disco reativo inserido na placa, produzindo uma nítida cor rosa em torno das colônias (SILVA et al., 2005).

Na figura 9 pode se observar-se o crescimento de colônias típicas nos diferentes tipos de placas de PetrifilmTM.

Figura 9 - Visualização do crescimento de colônias típicas em placas de PetrifilmTM



Fonte: 3MTM Microbiology, 2008

A *Association Official Analytical Chemists* (AOAC) reconhece a placa de PetrifilmTM AC, CC, RCC, HSCC, EC, YM, RSA como método oficial (AOAC, 2002). A *Association Française de Normalisation* (AFNOR) também valida como oficial as placas de PetrifilmTM AC, EB, CC, RCC, HSCC, EC, RSA (AFNOR VALIDATION, 2011).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento reconhece a placa PetrifilmTM EC para produtos de origem animal (BRASIL, 2005).

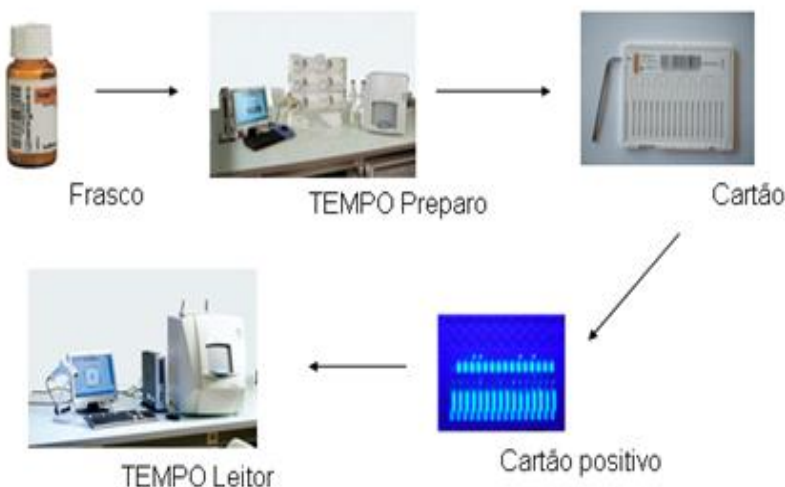
1.6.2.3. Sistema TEMPO[®] (Biomérieux S.A.)

O sistema TEMPO[®] (Biomérieux S.A.) é um dos mais recentes sistemas automatizados de enumeração de indicadores da qualidade microbiológica de alimentos. Oferece minimização e simplificação das etapas de análise, proporciona segurança ao trabalhar com material potencialmente infeccioso (KUNICKA 2007; TORLAK; AKAN; GOKMEN, 2008).

O sistema TEMPO[®] (Biomérieux S.A.) é composto por duas estações de trabalho: a estação Preparo e uma estação Leitura (Figura 10). O sistema usa um frasco contendo meio de cultura desidratado específico para o grupo de microrganismos a serem enumerados e um indicador de fluorescência, sendo reconstituído com água estéril e inoculado com a amostra teste. O meio inoculado é transferido automaticamente pelo TEMPO[®] Preparo para um cartão contendo 48 poços de três diferentes volumes. O cartão é hermeticamente selado para evitar risco de contaminação durante a manipulação e após são incubados (CROWLEY et al., 2010).

Durante a incubação, o crescimento microbiano hidrolisa o substrato do meio de cultura, produzindo um sinal fluorescente. Após o período de incubação o cartão é colocado no TEMPO[®] Leitor que detecta o sinal fluorescente. O TEMPO[®] Leitor calcula o número de poços positivos e expressa os resultados em UFC/mL (CROWLEY et al., 2010).

Figura 10 - Ilustração do sistema TEMPO® (Biomérieux S.A.)



Fonte: BIOMERIEUX, 2011

O cartão é projetado para simular a técnica do Número mais provável (NMP), mas com 16 repetições, são três fileiras de 16 poços cada, com um volume de 225 μ l na primeira linha, 22,5 μ l na segunda e 2,25 μ l na terceira, em vez da habitual série de três ou cinco tubos, reduzindo assim a incerteza do método e permitindo uma quantificação precisa (OWEN; WILLIS; LAMPH, 2008; JASSON et al., 2010).

O sistema TEMPO® está disponível no mercado para contagem da microbiota mesófila aeróbia (TEMPO® TVC) com leitura em 40 - 48 horas *Enterobacteriaceae* (TEMPO® EB), coliformes (TEMPO® CC), *Escherichia coli* (TEMPO® EC), *Staphylococcus aureus* (TEMPO® STA), todos com leitura em 22 - 27 horas bactérias Lácticas (TEMPO® LAB), com leitura em 40 - 48 horas e o TEMPO® YM para a contagem de bolores e leveduras com resultado em 72 horas (BIOMERIEUX, 2011).

O princípio de detecção do método baseia-se no crescimento do microrganismo e na reação fluorescente produzido pela molécula 4-Metil umbelliferone (4MU). No TEMPO® TVC para contagem da microbiota mesófila aeróbica e no TEMPO® EC para contagem de *Escherichia coli*, o princípio de detecção é o mesmo, o crescimento do microrganismo hidrolisará o meio de cultura durante a incubação, produzindo, desse modo, um sinal fluorescente. Entretanto, no TEMPO®

EC o meio de cultura é seletivo 4-metilumbelliferil- β -D-glicoronideo (MUG) e será hidrolizado pela enzima β -glicoronidase produzida pela *Escherichia coli* (CROWLEY et al., 2009; CROWLEY et al., 2010).

No TEMPO[®] EB para Enterobactérias, no TEMPO[®] CC para Coliformes e no TEMPO[®] STA para *Staphylococcus aureus*, o princípio de detecção baseia-se na acidificação do meio provocada pela fermentação do carboidrato, resultando na extinção de fluorescência em tubos de reação positiva (JOHNSON et al., 2009; JOHNSON et al., 2010)

São reconhecidas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e pela *Association Françoise de Normalisation* (AFNOR) o TEMPO[®] TVC, CC, EC e EB (AOAC INTERNATIONAL, 2011 e AFNOR VALIDATION, 2011).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals**. 3 ed, Washington: Pan American Health Organization, 2003.

AFNOR VALIDATION. **Validated Methods**. Disponível em: <<http://www.afnor-validation.com/download/List%20of%20methods%20certified%20NF%20VALIDATION.pdf>>. Acesso em: 11 março. 2011.

AL-GALLAS, N.; AISSA, R. R. B.; ANNABI, T. A.; BAHRI, O.; BOUDABOUDS, A. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. **Food Microbiology**, v.19, p.389-398, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed., Washington, D.C. 2001. 1219 p.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 17th ed., Washington, DC: Association Official Analytical Chemists, v. 1, 2002.

AOAC INTERNATIONAL. **Performance Tested Methodssm Validated Methods**. Disponível em: <<http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>>. Acesso em: 11 março. 2011.

ATEBA, C. N.; BEZUIDENHOUT, C. C. Characterisation of *Escherichia coli* O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p. 181-188, 2008.

ATEBA, C. N.; MBEWE, M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. **Research in Microbiology**, v. xx, p.1-9, 2011.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; PACHEMSHY, J.A.S.; SANTANA, E.H.W.; FRANCO, B.D.G.M. Quality of pasteurized milk influences the performance of ready-to-use systems for enumeration of aerobic microorganisms. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 413-418, 2002.

BIOMERIEUX. **BioMérieux's New TEMPO® Solution Delivers Rapid Results on Direct Enumeration of Yeast and Molds to Improve Food Safety**. Disponível em: <http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industry-microbiology/dynPage?doc=NDY_NWS_NWS_G_PRS_RLS_29>

Acesso em: 13 maio, 2011.

BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 119-130, 1999.

BRASIL. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 11 março. 1996. Seção I, p. 3977.

BRASIL. Portaria n. 166, de 05 de maio de 1998. Criar Grupo de Trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade e à modernização do setor produtivo de leite e derivados no Brasil. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 06 maio. 1998. Seção I, p. 42.

BRASIL. Portaria n. 56, de 07 de dezembro de 1999. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 08 dez. 1999. Seção I, p. 34-45.

BRASIL. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL, Instrução Normativa n. 40, de 12 de dezembro de 2005. Aprova os Métodos Analíticos, Isolamento e Identificação da *Salmonella* na carne bovina, avicultura e produtos derivados de ovos - MLG - 4.03, Metodologia Alternativa de *Salmonella* A-Bax -MLG 4C .01, Isolamento e Identificação de *Listeria monocytógenes* em carne vermelha, carne de ave, ovos e amostras ambientais, MLG 8.04 - Metodologia Alternativa de *Listeria* A-BAX MLG-8 A .01, *Escherichia coli*, MPN AOAC 966.24, Método Petrifilm AOAC 998.08, que passam a constituir Padrões Oficiais para Análise de Microbiologia de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 16 dez. 2005, Seção 1, p 70.

BRASIL. Instrução Normativa n.62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Cru refrigerado, Leite Pasteurizado,

Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel,

Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1.

CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n. 3, p. 278-286, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).**Salmonella**. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html>>. Acesso em: 29 outubro. 2012a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).**Foodborne Outbreak Online Database (Food)**. Disponível em:</<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>>. Acesso em: 17 novembro. 2012b.

CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v. 21, p. 535-541, 2004.

COSTA, F. N.; FERREIRA, J. C. A.; ALVES, L. M. C. Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo “C” produzido e comercializado na cidade de Imperatriz/MA. **Ars. Veterinária**, Jaboticabal, SP, v.18, n.2, p.137-141, 2002.

COSTA, F. F. **Interferência de Práticas de Manejo na Qualidade Microbiológica do Leite Produzido em Propriedades Rurais**

- Familiares.** 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Produção Animal) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, SP, 2006.
- CROWLEY, E. S.; BIRD, P. M.; TORONTALI, M. K.; AGIN, J. R.; GOINS, D. G. TEMPO® TVC for the Enumeration of Aerobic Mesophilic Flora in Foods: Collaborative Study. **Food Biological Contaminants**, v. 92, n.1, p. 165-174, 2009.
- CROWLEY, E.; BIRD, P.; TORONTALI, M.; GOETZ, K.; AGIN, J.; GOINS, D. TEMPO EC for the enumeration of *Escherichia coli* in Foods: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 2, p. 576-586, 2010.
- CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.
- DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 3 ed, Washington: ASM Press, 2007, 1038p.
- EVANGELISTA, D.T. **Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos.** 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2008.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Countries by Commodity.** 2010. Disponível em < <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en> > Acesso em 07 mar. 2012.
- FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. AOAC international methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal AOAC International**, v.85, p. 1187 – 1200, 2002.
- FELLOWS, P. **Tecnologia do processamento de alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.
- FRANCHIN, P. R. **Comparação de Metodologias Alternativas para Detecção de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em Carnes e Produtos Cárneos,** 2008. 114 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.
- FRANCO, B. D. G. M. **Métodos rápidos de análise microbiológica de Alimentos: Estudo crítico e Avaliação de novas Metodologias,** 1994.

133 f. Tese (Livre-Docência junto ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1994.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005, 182p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2002, p. 424.

GARCIA, P. M.; ARCUR, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de *Escherichia coli* O157H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p 1241-1249, 2008.

GARRIDO, N. S.; MORAIS, J. M.; BRIGANTI, R. C.; OLIVEIRA, M. A.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, S. A. V.; FÁVARO, R. M. D. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n.2, p. 141-146, 2001.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R.F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-22, 2005.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9.ed. Editora Williams & Wilkins, 1994, 787p.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Produção da Pecuária Municipal, v. 38, p.1-65, 2010.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microrganisms in food 6 - Microbial Ecology of food commodities**, 2ª ed. New York, 2005.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**, v.27, n.6, p.710-730, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 711 p.

JOHSON, R. L.; MILLS, J. C.; BEZZOLE, L. Biomerieux TEMPO® CC Test Granted PTM Status, **AOAC Internacional**, v. 1, p. 40-43, 2009.

JOHSON, R. L.; MILLS, J. C.; REVELES, J. C. Biomerieux TEMPO® STA Test Granted PTM Status, **AOAC Internacional**, v. 1, p. 31-32, 2010.

- JORGE, L. S. **Comportamento do *Campylobacter jejuni* em diferentes substratos e comparação entre metodologias convencionais e métodos imunoenzimáticos para sua recuperação**, 2005. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.
- KARMALI, M. A.; GANNON, V.; SARGEANT, J. M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 360-370, 2010.
- KAULING, F. **Condições higiênicas definem qualidade de leite por meio da contagem de células somáticas – CCS**, 2008. 42 f. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Castelo Branco, Campo Grande, MS, 2008.
- KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, American Public Health Association: Washington, 2001, p.69-82.
- KUNICKA, A. Health and Medicine. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p.69–72, 2007.
- LAW, D. A review: Virulência factors of *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin-producing *E. coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p. 729-745, 2000.
- LIMA, A. F. ***Staphylococcus coagulase positiva* e enterotoxinas em queijo coalho**. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2005.
- MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RADSTROM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.
- MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade do leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008.
- MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, B. P. D. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p.173-182, 2010.
- MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; ABRANTES, M. R. Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão. **Acta Veterinária Brasília**, v.3, n.1, p. 5-12, 2009.

MORAES, C. R.; FUENTEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG, A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica do leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p.259-264, 2005.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos Rápidos e Automatizados para Enumeração de Microrganismos Indicadores em Leite – Utilização no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n.1, p. 115-126, 2000.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras Brasileiras: Perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005a.

NERO, L. A. **Listeria e Salmonella spp em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. 2005. 159 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005b.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.

OBESO, J. M.; GARCIA, P.; MARTÍNEZ, B.; ARROYO-LOPEZ, F. N.; GARRIDO-FERNANDEZ, A.; RODRIGUEZI, A. Use of Logistic Regression for Prediction of the Fate of *Staphylococcus aureus* in Pasteurized Milk in the Presence of Two Lytic Phages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n.18, p. 6038-6046, 2010.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**, v. 2. Alimentos de Origem Animal. Porto Alegre: Artmed, 2005, 279 p.

ORTOLANI, M. B. T.; VIÇOSA, G. N.; BELOTI, V.; NERO, L. A. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in PetrifilmTM Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. **Journal of Dairy Research**, v.74, p. 387-391, 2007.

OWEN, M.; WILLIS, C.; LAMPH, D. Evaluation of the TEMPO® most probable number technique for the enumeration of *Enterobacteriaceae* in food and dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, n. 109, p. 1810-1816, 2010.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; LEAL, T. C. A. LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializados na cidade do Recife, Pernambuco,

- Brasil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.2, p. 167-171, 2001.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade Microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.
- REITER, M. G.; LÓPEZ, C.; JORDANO, R.; MEDINA, L. M. Comparative Study of Alternative Methods for Food Safety Control in Poultry Slaughterhouses. **Food Anal. Methods**, v. 3, p. 253-260, 2010.
- ROSOOLY, R.; DO, P. M. Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 290-294, 2010.
- SANDRINI, C. N. M.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 175-182, 2007.
- SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos Simplate TPC-CI e Petrifilm AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 60-64, 2002.
- SARIMEHMETOGLU, B.; AKSOY, M. H.; AYAS, N. D. ; AYAZ, Y.; KUPULU, O.; KAPLAN, Y. Z. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. **Food Control**, v. 20, p. 357-361, 2009.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; FILHO, A.N.; DIMENSTEIN, A.R. Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, v.10, n.42, p.25-27, 1996.
- SENYK, G.F.; KOZLOWSKI, S.M.; NOAR, P.S.; SHIPE, W.F.; BANDLER, D.K. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1152-1158, 1987.
- SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; CONTRERAS, C.; BERAQUET, N. J.; YOKOYA, F.; NASCIMENTO, C. A.; OLIVEIRA, V. M.; TSE, C, L. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 223-227, 2001.
- SILVA, N.; SILVEIRA, N.F.A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M. M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistências aos

agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.2, p. 167-173, 2003.

SILVA, N. ***Escherichia coli* O157:H7 em Alimentos**. 2004. 106 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, 2004.

SILVA, B. O.; CARAVIELLO, S. Z.; RODRIGUES, A. C.; RUEGG, P. L. Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Samples. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3000-3008, 2005.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R. OLIVEIRA, T. C. R.M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006.

SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A.C. S.; MELO, R. O.; OLIVEIRA, J. O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p. 226-230, 2008.

SILVA, A. P; CARVALHO, I. T.; LIMA, M. G. A. Qualidade sanitária de queijo prato, comercializado em supermercados de pequeno e médio porte na cidade de Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v.22, n.158, p.92-97, jan/fev.2008.

SOUZA, G. N.; STOCK, L. A.; CARNEIRO, A. V. SANTOS, F. R.; CARDOSO, M.; RODRIGUES, M. C.; FARIA, C. G. Percepção das empresas de laticínios sobre os limites de indicadores de qualidade estabelecidos na Instrução Normativa 51 e em programas de pagamento de leite. Ano 4, n.41, 2010. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/panorama/produtos41.html>. Acesso em: 08 fev 2011.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 3, p. 449-454, 2007.

TAVOLARO, P.; FERRATI, A. R.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. **Brazilian journal of microbiology**, v. 36, p. 295-300, 2005.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.753-760, 2008.

TETRA PAK. **Equipamentos de Processo, produtos lácteos, Ultra Fresh**, 2012. Disponível em: <http://www.tetrapak.com.br/negocios/equipamentos_proc/equipamento_s_prod_lacteos03.asp?etipo=1&estipo=8>. Acesso em: 04 fev. 2012.

TIMM, C. D.; GONZALES, H. L.; OLIVEIRA, D. S.; BÜCHLE, J.; ALEXIS, M. A.; COELHO, F. J. O.; PORTO, C. Avaliação da Qualidade Microbiológica do Leite Pasteurizado Integral, produzido em Microusinas da Região Sul do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, v. 17, n.106, p. 100-104, 2003.

TORLAK, E.; AKAN, I.M.; GÖKMEN, M. Comparison of TEMPO® EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. **Letters in Applied Microbiology**. v. 47, p. 566–570, 2008.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do Leite**. Santa Maria: UFSM, 2010, 203p.

VASAVADA, P. C. Rapid Methods and Automation in Dairy microbiology. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 10, p. 3101-3113, 1993.

WEILER, N.; LEOTTA, G. A.; ZARATE, M. N.; MANFREDI, E.; ALVAREZ, M. E.; RIVAS, M. Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada em La República del Paraguay. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 43, p. 33-36, 2011.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos Alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasi. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n.1, p. 44-48, 2010.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17th ed. Washington: American Public Health Association, 2004, 570p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. General information related to microbiological risks in food. Disponível em:

<<http://www.who.int/foodsafety/micro/general/en/index.html>>, Acesso em: 16 jul 2009.

WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in Domestic Animals**, New York: Cabi Publishing, 2000. 459p.

ZOCCAL, R.. **O Brasil produziu 30 milhões de litros em 2010**, ano. 6, n. 62, 2012a. Disponível em: < <http://www.cileite.com.br/content/o-brasil-produziu-30-bilh%C3%B5es-de-litros-em-2010>>. Acesso em: 08 mar 2012.

ZOCCAL, R. **Informações Técnicas**, Estatísticas do leite, Produção de leite nas principais Mesorregiões, 2012b. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/>>. Acesso em: 11 mar 2012.

ZOCHE, F.; BERSOT, L.S.; BARCELLOS, V.C.; PARANHOS, J.K.; ROSA, S.T.M.; RAYMUNDO, N.K. Qualidade Microbiológica e Físico-Química do Leite Pasteurizado Produzido na Região Oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**. v.7,n.2, p.59-67, 2002.

3M™ Petrifilm™, 3M™ Petrifilm™ Plate Certificates, Recognitions and Validations. Disponível em: <<http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=66666UuZjcFSLXTt4xTt8TEEVuQEcuZgVs6EVs6E666666-->>. Acesso em: 12 maio 2011.

3M DO BRASIL LTDA. **Petrifilm™ placa para contagem de aeróbios: Guia de Interpretação**. USA, 2001.

3M™ MICROBIOLOGY. **Plates & Plate Reader**, Technician Productivity Maximized, USA, 2008.

CAPÍTULO 2

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PROVENIENTE DE LATICÍNIOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA - BRASIL EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PROVENIENTE DE LATICÍNIOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA - BRASIL EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO

Andréia Cirolini¹; Andressa Mara Baseggio²; Roberta Juliano Ramos³; Helen da Silva Silvestre¹; Marília Miotto¹; Cleide Rosana Werneck Vieira^{4*}

¹ Estudantes de Pós - graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC

² Bolsista de Iniciação Científica CNPq/ UFSC

³ Prof. do Centro Universitário Estácio de Sá de Santa Catarina

⁴ Prof. do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFSC.

* Autor para correspondência: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rodovia Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: deiacirolini@yahoo.com.br

Artigo a ser submetido à revista: Ciência e Tecnologia de Alimentos

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica do leite proveniente de laticínios do Estado de Santa Catarina em diferentes épocas do ano, foram analisadas 402 amostras deste produto de dezembro de 2009 a novembro de 2011, das quais em 165 amostras de leite cru foram pesquisadas contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos e *Staphylococcus aureus*. Em 141 amostras de leite pasteurizado foi avaliada a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos, *Enterobacteriaceae*, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* e em 96 amostras de leite UHT, a avaliação foi realizada por meio da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e psicrotróficos. Os resultados indicaram altas contagens de mesófilos aeróbios e psicrotróficos no leite cru, amostras fora do padrão estabelecido pela legislação para mesófilos aeróbios, *Enterobacteriaceae*, Coliformes a 35°C e *Escherichia coli* no leite pasteurizado e resultados de acordo com a legislação no leite UHT. Pode-se concluir que a necessidade de investimentos em programas de boas práticas agrícolas e de fabricação para assegurar a qualidade do leite cru e pasteurizado.

Palavras-chave: leite, qualidade microbiológica, avaliação, Santa Catarina, épocas do ano.

ABSTRACT

The aim of the present work was to analyze the microbiological quality of milk from the State of Santa Catarina in different seasons. 402 samples were analyzed from December 2009 to November 2011. Mesophilic aerobic bacteria, psychrotrophic bacteria and *Staphylococcus aureus* countings were performed in 165 samples of raw milk; Mesophilic aerobic bacteria, psychrotrophic bacteria, *Enterobacteriaceae*, Coliforms at 35°C, coliforms at 45°C, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 countings were performed in 141 samples of pasteurized milk; and mesophilic aerobic bacteria and psychrotrophic bacteria countings were performed in 96 UHT milk samples. Results showed high counts of mesophilic aerobic bacteria and psychrotrophic bacteria in raw milk as well as samples which were not in accordance with the legislation for mesophilic aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, Coliforms at 35°C and *Escherichia coli* in pasteurized milk samples. Results for UHT samples were in agreement with the regulations. There is an urgent need of investments in programs supporting agricultural and manufacturing good practices in order to ensure the quality of raw and pasteurized milk.

Key-words: milk, microbiological quality, evaluation, Santa Catarina, seasons.

1. INTRODUÇÃO

Por sua riqueza de nutrientes, o leite é considerado um dos alimentos mais completos, sendo amplamente consumido por todas as faixas etárias, porém, ele é susceptível ao desenvolvimento de um grande número de microrganismos (ATAIDE et al., 2008).

A qualidade microbiológica do leite pode ser comprometida por diversos fatores como práticas inadequadas de produção e manuseio na propriedade rural, influência das estações do ano, temperatura, transporte de matéria prima, contaminações no âmbito da indústria processadora e também durante a distribuição do produto até a chegada ao consumidor (SILVEIRA; CARVALHO; TEIXEIRA, 2000; ORDÓÑEZ et al., 2005; ICMSF, 2005).

O Brasil é um dos maiores produtores de leite no mundo, ocupando a quinta maior produção com mais de 30 bilhões de toneladas (FAO, 2010). Porém, inúmeras pesquisas têm verificado a ocorrência de amostras de leite com baixa qualidade microbiológica (COSTA; FERREIRA; ALVES, 2002; MORAIS et al., 2005; NERO et al., 2005; ARCURI et al., 2006; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; MARTINS et al., 2008; TEBALDI et al., 2008, MATTOS et al., 2010).

Considerando os problemas inerentes da produção leiteira, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou mecanismos legais para a qualidade higiênico-sanitária do leite, como a elaboração da Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011) revisando a Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002), a qual reúne novas normas de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e o seu transporte a granel.

É fundamental o controle higiênico-sanitário, desde a obtenção de leite cru nas fazendas até a embalagem do produto final, pois a sua produção, sob condições inadequadas de higiene, torna-o veículo de transmissão de doenças à população consumidora (CARDOSO; ARAÚJO, 2003).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica do leite cru, pasteurizado e UHT provenientes de laticínios do estado de Santa Catarina – Brasil em diferentes épocas do ano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

As amostras foram obtidas de sete (7) laticínios com inspeção federal - SIF do estado de Santa Catarina no período de dezembro de 2009 a novembro de 2011. A coleta foi realizada pelo fiscal sanitário do Ministério da Agricultura (SFA/SC) responsável pela fiscalização da indústria.

Foram coletadas mensalmente 17 amostras de leite sendo que: de sete (7) laticínios foram coletados 200 mL de leite cru do tanque de refrigeração de cada indústria; de seis (6) laticínios foram coletadas uma amostra indicativa de 1L de leite pasteurizado de cada indústria, e de quatro (4) laticínios, foram coletadas uma amostra indicativa de 1L de leite UHT de cada indústria, totalizando 402 amostras, das quais, 165 amostras de leite cru, 141 amostras de leite pasteurizado e 96 amostras

de leite UHT (3 amostras de leite cru e 3 amostras leite pasteurizado foram excluídas por apresentaram problemas).

As amostras foram coletadas e armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, a fim de manter a temperatura inferior a 4°C (BRASIL, 2002). Após, foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, onde foi realizada a verificação da temperatura com termômetro digital (Wertern®). As amostras do leite cru foram transportadas em frascos estéreis de 50 mL, contendo o conservante em comprimido azidiol (Embalpharma®) (BRITO, 2007).

2.2. Análises Microbiológicas

As embalagens foram abertas assepticamente e, em seguida, realizadas as diluições decimais utilizando-se água peptonada (0,1%) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England).

Nas amostras de leite cru foram realizadas às análises de microrganismos mesófilos aeróbios, *Staphylococcus aureus* e psicotróficos. No leite pasteurizado, foram efetuadas as análises de microrganismos mesófilos aeróbios, *Enterobacteriaceae*, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C, *Escherichia coli* sp, psicotróficos, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157H7. No leite UHT, foram realizadas as análises de microrganismos mesófilos aeróbios e contagem de psicotróficos.

Somente as análises de psicotróficos e *Staphylococcus aureus* foram realizadas de dezembro de 2010 a novembro de 2011.

2.2.1 Microrganismos mesófilos aeróbios

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios no leite cru e pasteurizado foi realizada de acordo com Laird et al (2004). Alíquotas de 1,0 mL das diluições foram transferidas para placas de petri em duplicata e adicionado ágar de contagem em placa (PCA - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) previamente fundido e mantido a 44°C-46°C em banho-maria. As placas foram incubadas a 32° ± 1°C por 48 horas.

Para a contagem de mesófilos no leite UHT foi realizado conforme o método descrito por BRASIL (2003). Realizou-se uma pré-incubação do leite UHT por sete dias a 36°C (± 1°C), após foi feita a diluição e inoculação em duplicata 1 mL da amostra em placas de ágar cérebro de coração (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e

água nutriente isento de extrato de levedura (Difco/USA) incubou-se a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 72 horas. Selecionaram-se placas com 25-250 colônias. Foi observado o crescimento de *Bacillus sporothermodurans*, o qual não deve ser contabilizado no cálculo de mesófilos aeróbios, através dos testes de Gram, catalase, oxidase, crescimento em anaerobiose, hidrólise de esculina, fermentação da glicose, redução de nitrato e prova de uréase.

2.2.2 Enterobactérias

Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições foram transferidas para placas de petri e adicionado cerca de 15 mL do meio de cultura água vermelho violeta bile glicose (VRBG - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) previamente fundido e mantido a 46°C-48°C em banho-maria. Após solidificação foi adicionado uma segunda camada com o mesmo meio deixando-o solidificar, sendo incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Decorrido esse período foi realizada a contagem das colônias vermelhas com 0,5 a 2 mm de diâmetro. Selecionou-se de 3 a 5 colônias típicas e repicou-se para tubos de água nutriente (AN - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) sendo incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e após confirmados com as provas de Gram e oxidase (BRASIL, 2003).

2.2.3 Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli*

Os ensaios de Coliformes a 35°C e *Escherichia coli* foram realizadas de acordo com Davidson, Roth e Gambrel-Lenarz (2004) e Coliformes a 45°C de acordo com Brasil (2003).

Foram transferidos 1 mL da amostra para cada tubo de uma série de três tubos (10^0 , 10^1 , 10^2) contendo o Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST- Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e incubou-se a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 48 horas.

De cada tubo de LST com turvação e produção de gás, foram transferidos 100 µL dos tubos positivos para tubos de Caldo Verde Brilhante 2% lactose (BVB - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e para tubos com Caldo *Escherichia coli* (EC - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). Os tubos de BVB foram incubados a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 48 horas e os tubos de EC em banho-maria a 45,0°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) por 48 horas. A partir dos tubos de EC com turvação e produção de gás, foi realizada estrias em placas de Agar Eosina Azul de Melileno (EAM - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) por

esgotamento, incubando-as a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24 horas. As colônias típicas de *Escherichia coli* foram submetidas à série bioquímica: Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato (IMViC). O resultado final de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C foi expresso a partir da tabela do Número Mais Provável (NMP), pela combinação do número de tubos positivos em cada série da diluição, em que a positividade caracteriza-se pela turvação e pela produção de gás em cada tubo individualmente. As contagens de *Escherichia coli* foram feitas a partir da confirmação das colônias isoladas no EAM na série bioquímica do IMViC, também expressos pela combinação de isolados positivos, através da tabela do NMP.

2.2.4 Contagem de psicrotróficos

Para a contagem de psicrotróficos, alíquotas de 100 μl foram inoculadas em duplicata, com o auxílio da alça de drigalski esterilizada, na superfície de placas de ágar para contagem em placas (PCA - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e incubadas a 7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 10 dias. Após, foram contadas as placas que apresentavam entre 25-250 colônias (BRASIL, 2003).

2.2.5 *Staphylococcus aureus*

A contagem de *Staphylococcus aureus* foi realizada de acordo com BRASIL (2003). Alíquotas de 100 μl foram inoculadas em duplicata, com o auxílio da alça de drigalski esterilizada, na superfície de placas de ágar Baird Parker (BP-Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e incubadas a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 48 horas. Decorrido esse período foi realizada a contagem das colônias típicas (negras brilhante com halo claro) e atípicas (acinzentadas ou negras brilhantes sem halo). Selecionou-se de 3 a 5 colônias típicas e atípicas e repicou-se para tubos de ágar cérebro de coração (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, sendo após confirmados pelo testes da coagulase, Gram, termonuclease e catalase.

2.2.6 *Salmonella* spp

A análise de *Salmonella* spp foi efetuada segundo o método convencional descrito por Brasil (2003) e pelo sistema Vidas® (Biomérieux) (AOAC, 2002). Pela metodologia convencional realizou-

se um pré-enriquecimento em água peptonada tamponada (APT - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) a 37°C por 24 horas a partir de 25 g da amostra. Sendo transferida para o caldo tetrationato (TTB - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e o caldo Rappaport Vassiliadis (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) por 24 hora a 42,5°C. Na sequência semeou-se em placas de ágar verde brilhante, vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e ágar XLD (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) a 37°C, por 24 horas. Colônias típicas foram feitas uma triagem bioquímica em Ágar ferro três açúcares (TSI - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England), Ágar lisina (LIA , Basingstoke, Hampshire, England) e ágar ureia (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e, na sequência, realizou-se a confirmação bioquímica.

Pelo sistema Vidas® (Biomérieux S.A.) SLM inoculou-se 25g de amostra em 225 mL de água peptonada tamponada (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) a 37°C por 24 horas. Retirou-se 100 µl do caldo de enriquecimento e transferiu-se para o Caldo SX2® (Biomérieux S.A.) por 22-26 horas a 41, 5 °C (±1°C). Transferiu-se 0,5 mL para uma barrete STR® (Biomérieux S.A.) onde foi posto no Vidas Heat & GO® (Biomérieux S.A.) a 131°C para aquecimento por 15 minutos, deixou-se esfriar por 15 minutos e foi colocado no equipamento mini-Vidas® (Biomérieux S.A.) para a detecção do patógeno.

2.2.7 *Escherichia coli* O157H7

Para a identificação de *Escherichia coli* O157:H7 utilizou-se a metodologia convencional (MENG, FENG e DOYLE, 2001) e a metodologia do sistema Vidas® (Biomérieux S.A.) (AOAC, 2002).

Na detecção de *Escherichia coli* segundo metodologia convencional, foi inoculado 25 mL de amostra em 225 mL de EEB = caldo de enriquecimento EHEC [caldo TSB (TSB-Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) suplementado com sais biliares nº3 (Difco/USA), K₂HPO₄ (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e cefixima, cefsulodina e vancomicina (VCC- Sigma-Aldrich, USA)] a 37°C por seis horas com agitação. Em continuidade, retirou-se uma alíquota de 100 µl e inoculou-se em placas TC-SMAC [Ágar MacConkey Sorbitol (Difco/USA) suplementado com cefixima-telurito (CT- Biomérieux S.A.)] e incubou-se a 37 °C *overnight*. O caldo de enriquecimento EHEC foi re-incubado *overnight* a 37°C. Foram observadas nas placas o crescimento de colônias cinzas neutras com

centro esfumado (1-2 mm). Caso não ocorresse crescimento de colônias típicas, repetia-se o plaqueamento em placas TC-SMAC utilizando o caldo de enriquecimento incubado *overnight*. Selecionaram-se cinco a 10 colônias para TSA (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) com 0,6% de extrato de levedura e incubou-se *overnight* a 37°C. Após, foi realizado o teste de indol. Sendo as colônias isoladas indol positivo a confirmação foi realizada com testes sorológicos (antisoro O157 – Probac do Brasil) e *kits* miniaturizados (Api 20 E - Biomérieux S.A.).

Para a análise no sistema Vidas[®] (Biomérieux S.A.) ECO, foi inoculado 25 mL de amostra em 225 mL de m-TSB [caldo TSB (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) suplementado com sais biliares n°3 (Difco/USA), K₂HPO₄ (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e cloridrato de acriflavina (Sigma-Aldrich, USA)] a 41°C por seis horas. Após, retirou-se 1 mL do caldo de enriquecimento e transferiu-se para o caldo CT-MAC [Caldo MacConkey (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England), suplementado com cefixima-telurito (CT- Biomérieux S.A.)] e foi incubado por 24 horas a 37 °C (±1°C). Decorrido esse período, transferiu-se 0,5 mL para a barrete STR[®] (Biomérieux S.A.) e colocado no Vidas Heat & Go[®] (Biomérieux S.A.) a 131°C para aquecimento por 15 min, retirou-se e deixou-se esfriar por 15 minutos, colocando-se, em seguida, no equipamento mini-Vidas[®] (Biomérieux S.A.) para a leitura e detecção do patógeno. A confirmação dos resultados positivos foi procedida a partir do caldo CT-SMAC com isolamento em ágar CT-SMAC por 24 horas a 37°C e realizando a confirmação conforme testes clássicos descritos nos métodos normalizados pela ISO.

2.3. Análise Estatística

Os resultados dos ensaios microbiológicos do monitoramento foram agrupados em trimestres (primeiro trimestre: dezembro, janeiro e fevereiro; segundo trimestre: março, abril e maio; terceiro trimestre: junho, julho e agosto; quarto trimestre: setembro, outubro e novembro). Os dados foram convertidos para a forma logarítmica e submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% e após teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica[®] 8.0 (STATSOFT, INC, STATISTICA, 2004).

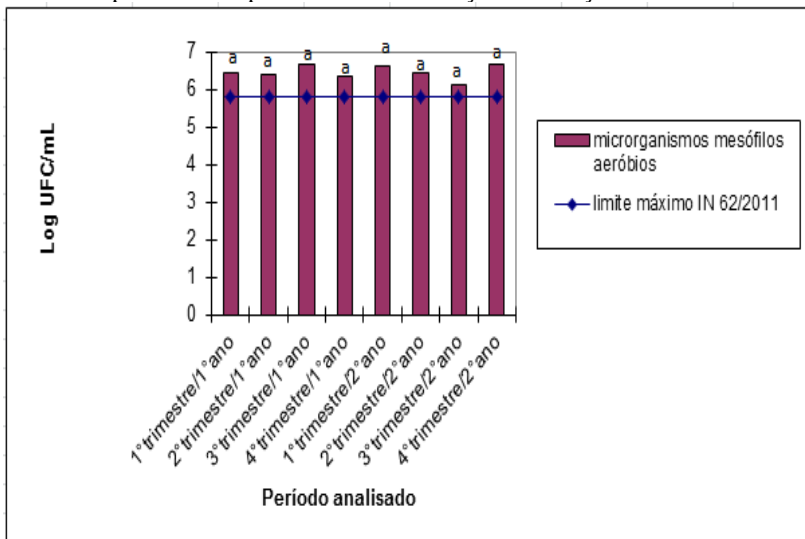
Para fins de cálculos estatísticos, sempre que os resultados obtidos foram <1 UFC/mL e <0,3 UFC/mL estes resultados foram

substituídos pelo número imediatamente inferior, ou seja, 0,9 UFC/mL e 0,2 UFC/mL, respectivamente.

3. RESULTADOS

Pode-se observar na Figura 1 os resultados das médias geométricas da contagem de microrganismos mesófilos no leite cru. A temperatura média do leite cru no momento da chegada ao laboratório foi de 4,7°C.

Figura 1. Médias geométricas da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (log UFC/mL) no leite cru proveniente de laticínios do estado de SC analisadas por trimestre por dois anos em relação à Instrução Normativa 62



Observa-se que as médias geométricas das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios não apresentaram diferença estatística entre os diferentes trimestres nos dois anos de análise. Se verifica na Figura 1, que todas as contagens ficaram acima do valor máximo permitido pela legislação. As médias geométricas de microrganismos mesófilos aeróbios variaram de 6,20 log UFC/mL a 6,75 log UFC/mL.

Em relação a contagem de microrganismos psicotróficos as médias foram analisadas com os dados obtido no período de um ano apresentando contagens de 6,83 log UFC/mL no primeiro trimestre, 7,08

log UFC/mL no segundo trimestre, 6,88 log UFC/mL no terceiro trimestre e 6,71 log UFC/mL no quarto trimestre.

Apenas três amostras de leite cru apresentaram contagens de *Staphylococcus aureus* (3,20 log UFC/mL, 3,70 log UFC/mL e 4,0 log UFC/mL), no período analisado (dezembro de 2010 a novembro de 2011).

Em relação ao leite pasteurizado, a temperatura média dos leites pasteurizados no momento da chegada ao laboratório foi de 4,4 °C, os resultados das contagens médias de microrganismos no leite pasteurizado encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Contagens médias de microrganismos no leite pasteurizado proveniente de laticínios do estado de SC analisado por trimestre por dois anos em relação ao padrão máximo permitido pela legislação vigente

Microorganismo	Mesófilos aeróbios (log UFC/mL)	<i>Enterobact.</i> (log UFC/mL)	Coliformes a 35°C (log NMP/mL)	Coliformes a 45°C (log NMP/mL)
Padrão máximo pela Legislação	4,90 log UFC/mL (BRASIL, 2011)	0,70 log UFC/mL (CE, 2007)	0,60 log NMP/mL (BRASIL, 2011)	0,30 log NMP/mL (BRASIL, 2011)
1º ano				
1º trimestre	4,72	1,71	0,92	-0,70
2º trimestre	4,71	2,71	-0,15	-0,52
3º trimestre	4,85	2,92	0,89	-0,52
4º trimestre	5,63	3,38	1,15	-0,52
2º ano				
1º trimestre	5,00	3,80	0,88	-0,70
2º trimestre	5,11	0,85	0,04	-0,70
3º trimestre	4,73	0,23	0,04	-0,70
4º trimestre	6,25	2,56	1,49	-0,40

1º ano: dezembro de 2009 a novembro de 2010

2º ano: dezembro de 2010 a novembro de 2011

Pode-se observar através da Tabela 1 que a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios no leite pasteurizado no primeiro, segundo e terceiro trimestres do primeiro ano de pesquisa apresentaram-se de acordo com a legislação brasileira. No entanto, no segundo ano de pesquisa apenas o terceiro trimestre apresentou contagem de acordo com limite estabelecido pela legislação para microrganismos mesófilos aeróbios em leite pasteurizado.

De acordo com a legislação da Comunidade Européia para contagem de *Enterobacteriaceae* em leite pasteurizado, apenas o terceiro trimestre do segundo ano de análise ficou de acordo com o estabelecido pelo Regulamento 1441/2007.

Observa-se através da Tabela 1 que a enumeração de Coliformes a 35°C apenas o segundo trimestre do primeiro ano de pesquisa estava de acordo com o permitido pela legislação brasileira. No segundo ano de pesquisa, o segundo e terceiro trimestres apresentaram contagens de acordo com a legislação. Na enumeração de Coliformes a 45°C todas as amostras dentro do limite estabelecido na legislação brasileira.

A presença de *Escherichia coli* foi detectada em 8 das 141 amostras analisadas (5,55%), as contagens variaram de <0,3 a 2,3 NMP/mL.

Em relação à contagem de psicotróficos no leite pasteurizado as análises foram realizadas no período de um ano (dezembro de 2010 a novembro de 2011), as médias foram de 4,73 log UFC/mL no primeiro trimestre, 3,38 log UFC/mL no segundo trimestre, 4,32 log UFC/mL no terceiro trimestre e no 4,0 log UFC/mL quarto trimestre, os resultados mostraram altas contagens nos diferentes trimestres analisados.

Não foi encontrada a presença de *Staphylococcus aureus* nas amostras de leite pasteurizado no período o qual foi pesquisado (dezembro de 2010 a novembro de 2011). As 141 amostras de leite pasteurizado mostraram ausência de *Salmonella* sp e *Escherichia coli* O157:H7 no período analisado (dezembro de 2009 a novembro de 2011) tanto pela metodologia convencional como pelo sistema Vidas (Biomerieux).

Os resultados do leite UHT em relação a contagem de microrganismos mesófilos indicaram que apenas duas amostras apresentaram contagem durante os 24 meses analisados, sendo uma amostra no primeiro trimestre (1,85 log UFC/mL) e outra no terceiro trimestre (2,0 log UFC/mL) do primeiro ano de análise. Também não foi encontrado contagem de psicotróficos nas amostras de leite UHT.

4. DISCUSSÃO

O leite cru não apresentou diferença estatística significativa na contagem de microrganismos mesófilos nos diferentes períodos analisados, demonstrando que não sofreu interferência sazonal que pudesse causar alterações microbiológicas. Resultado semelhante foi encontrado por Fagan et al (2008), onde os resultados foram semelhantes nas diferentes estações do ano analisados. No entanto, Roma Júnior et al (2009) observou uma maior contagem de mesófilos no período da primavera, comparada as outras estações.

Em relação aos requisitos microbiológicos, a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011) revisando a Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002), estabelece que a partir de 01.01.2012, na região Sul, Sudeste e Centro Oeste, o limite máximo é de $6,0 \times 10^5$ UFC/mL de microrganismos mesófilos aeróbios para leite cru refrigerado, válido até 31.12.2014. A partir deste período o valor reduz para $3,0 \times 10^5$ UFC/mL, chegando a $1,0 \times 10^5$ UFC/mL a partir de 2016. Confrontando os dados com a legislação observa-se na Figura 1, todas as contagens de microrganismos mesófilos ficaram acima do limite estabelecido em todo o período analisado.

Santos (2011) destaca que, em 2009, um grande levantamento feito pela Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade de Leite (RBQL) com quase 1,7 milhão de análises, apontou que 42% das amostras analisadas não atendiam o padrão de contagem total. E salienta que o momento atual é uma oportunidade para encontrar soluções mais definitivas para problemas crônicos de qualidade e indicar possíveis estratégias de ação capazes de abrir oportunidade de melhoria da qualidade.

Altas contagens de microrganismos psicotróficos foram encontradas no leite cru. Estes microrganismos são produtores de enzimas termostáveis que comprometem a qualidade dos produtos finais (MORAIS et al., 2005; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006). No entanto, não existe nenhum padrão na legislação brasileira para contagem de psicotróficos. Pinto; Martins; Vanetti (2006) encontraram contagens de psicotróficos de $5,6 \times 10^5$ UFC/mL a $6,4 \times 10^6$ UFC/mL em silos industriais e destacam que seria imprudente a fabricação de produtos a partir do leite cru com contagem de psicotróficos superior a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Observa-se nos resultados encontrados em nosso estudo, que as contagens foram superiores a este valor, podendo desta forma acarretar problemas tecnológicos relacionados com a perda da qualidade e redução da vida de prateleira do leite e de produtos lácteos.

Foi encontrado um número reduzido de amostras com baixas contagens de *Staphylococcus aureus* na pesquisa. Reflexo de uma boa sanidade do rebanho, em virtude que este microrganismo é um dos principais agentes causadores da mastite bovina (ICMSF, 2005). Tebaldi et al (2008) analisaram o leite cru de 16 propriedades e encontram 8 cepas de *Staphylococcus aureus*.

Em relação ao leite pasteurizado a Instrução Normativa 62 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2011) estabelece um padrão máximo de $8,0 \times 10^4$ UFC/mL (4,90 log UFC/mL) para microrganismos mesófilos aeróbios em leite pasteurizado. Contagens de microrganismos mesófilos aeróbios acima do estabelecido pela legislação, indicando falhas no processamento do leite. Silva et al (2008) em um pesquisa com leite pasteurizado encontraram 25% das amostras impróprias de acordo com a legislação.

A legislação brasileira, porém não determina um limite padrão para contagem de *Enterobacteriaceae* em leite pasteurizado, no entanto a Comunidade Européia, através do Regulamento 1441/2007 (CE, 2007) fixa um limite de 5 UFC/mL (0,70 log UFC/mL). Durante o período analisado, apenas um trimestre mostrou estar de acordo com o Regulamento, demonstrando que nos demais semestres os resultados no processamento do leite pasteurizado não cumprem com o padrão estabelecido no Regulamento 1441/2007 da Comunidade Européia. Como destaca Ferraz; Cerqueira; Souza (2010), a presença de *Enterobacteriaceae* representa ineficácia nos procedimentos de higiene, podendo este grupo de microrganismos ser usado como indicador de risco na indústria de alimentos.

A legislação brasileira estabelece um limite de 4 NMP/mL (0,60 log UFC/mL) (BRASIL, 2011) para a contagem de Coliformes a 35° em leite pasteurizado. O baixo índice de amostras dentro do limite estabelecido pela legislação indica processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento. Considerando que Coliformes são destruídos na pasteurização, a presença destes no leite pasteurizado indica a necessidade de uma ação mais efetiva no controle da seleção de fornecedores de leite cru e na sanitização de equipamentos que entram em contato com o leite após pasteurização (SILVA et al., 2008).

No entanto, em relação a contagem de Coliformes a 45°C em todo o período analisado as amostras ficaram dentro do limite estabelecido, que é de 2 NMP/mL (0,30 log UFC/mL) (BRASIL, 2011). A legislação brasileira não estabelece um limite para *Escherichia coli*, porém, de acordo com a RDC 12 (BRASIL, 2001), em caso de pesquisa, a presença de *Escherichia coli* deve constar em laudo analítico.

Escherichia coli foram encontradas no período de análise (8/144), representando um risco em potencial. Silva et al (2001) encontraram em 90 amostras de leite pasteurizado 208 cepas de *Escherichia coli*.

Ataide et al (2008) analisando leite pasteurizado embalado encontraram resultados de Coliformes a 35°C que variam de <3 a $2,4 \times 10^3$ NMP/mL, detectaram em 57,1% das amostras a presença de Coliformes a 45°C e a presença de *Escherichia coli* foi confirmada em 35,7% das amostras.

Embora a legislação brasileira não apresente um padrão de contagem de microrganismos psicotróficos, altas contagens destes microrganismos no leite pasteurizado indicam más condições sanitárias de processamento do leite. Silva et al (2008) também encontraram altas contagens de microrganismos psicotróficos, variando de 10 a 10^6 UFC/mL. Como destaca Moraes et al (2005) microrganismos psicotróficos produzem enzimas termotolerantes; estas enzimas não afetam a qualidade do leite pasteurizado, pois possui tempo de validade restrito. No entanto, tais enzimas podem afetar a qualidade de outros produtos, principalmente o leite UHT, devido ao maior período de contato destas enzimas com seus substratos.

Staphylococcus aureus, *Salmonella* sp e *Escherichia coli* O157:H7 não foram encontradas no leite pasteurizado; semelhante resultado foi encontrado por ATAIDE et al (2008) analisando amostras de leite pasteurizado embalado. A pasteurização visa reduzir o número de bactérias potencialmente patogênicas ao nível que não se torne um problema de saúde pública (DOYLE; BEUCHAT, 2007). A legislação brasileira através da RDC 12 (BRASIL, 2001) estabelece ausência de patógenos.

Em relação ao leite UHT, em todo o período analisado, todas as amostras encontraram-se dentro do limite estabelecido para contagem de mesófilos aeróbios pela Portaria 146 (BRASIL, 1996), a qual estabelece um padrão de 100 UFC/mL.

Os laticínios avaliados que processam leite UHT usam o sistema Ultra Fresh™, baseado em um tratamento físico e hermético de centrifugação. Perry (2004) e Leite (2006) citam que o processo de Ultra Fresh™ (bactofugação) como uma alternativa para a remoção de microrganismos do leite.

Rossi Júnior et al (2006) encontraram algumas amostras de leite UHT com contagem de psicotróficos de 10 UFC/mL e destacam que problemas relacionados à qualidade dos produtos lácteos como alteração de sabor, odor, consistência e gelatinização ao longo vida de prateleira

do leite UHT podem ser relacionadas a atuação de enzimas proteolíticas e lipolíticas de origem bacteriana.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que as amostras de leite cru enfrentam dificuldades de adequação a legislação, já que os resultados mostraram altos níveis de contaminação por microrganismos mesófilos aeróbios e psicrotróficos.

No leite pasteurizado foram encontradas contagens fora do padrão permitido pela legislação para microrganismos mesófilos aeróbios, (*Enterobacteriaceae*), Coliformes a 35°C, *Escherichia coli* e também altas contagens de microrganismos psicrotróficos. Destaca-se a importância de um controle mais rigoroso com a matéria prima, na cadeia de processamento, na higiene de equipamentos e de manipuladores e com o produto após a pasteurização. Apenas a contagem de Coliformes a 45°C apresentou resultados abaixo do permitido pela legislação, além das contagens de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e *Escherichia coli* O157H7 que não foram identificadas.

No leite UHT baixas contagens microbiológicas encontradas permitem concluir que o processamento aplicado foi capaz de eliminar a carga microbiana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- ATAIDE, W. S.; MACIEL, J. F.; LIMA, P. L. A.; LIMA, A. R. C.; SILVA, F. V. G.; SILVA, J. A. Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n.1, p. 73-77, 2008.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 17th ed., Washington, DC: Association Official Analytical Chemists, v. 1, 2002.
- BRASIL. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 11 março. 1996.Seção I, p. 3977.

BRASIL. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial**. Brasília, janeiro de 2001.

BRASIL. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Instrução Normativa n.62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Cru refrigerado, Leite Pasteurizado, Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1.

BRITO, J. R. F.; SOUZA, G. N.; FARIA, C. G.; MORAES, L. C. D. Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias. **Circular Técnica nº 92 – Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, MG, Nov. 2007.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em leite comercializados no Distrito Federal, no período 1997-2001. **Higiene Alimentar**, v.17, n.114-115, p.34-40, 2003.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (CE) n. 1441, de 05 de dezembro de 2007. Altera o Regulamento (CE) n. 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**. 07 dez. 2007.

COSTA, F. N.; ARAÚJO FERREIRA, J. C.; COELHO ALVES, L. M. Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo “C” produzido e comercializado na cidade de Imperatriz/MA. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, SP, v.18, n.2, p.137-141, 2002.

DAVIDSON, P. M.; ROTH, L. A. GAMBREL-LENARZ, S. A. Coliform and other Indicator Bacteria. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, American Public Health Association: Washington, 2004, p.187-203.

- DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 3 ed, Washington: ASM Press, 2007, 1038p.
- FAGAN, E. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; JOBIM, C. C. Avaliações de padrões físico-químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.3, p.651-660, 2008.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Countries by Commodity**. 2010. Disponível em < <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en> > Acesso em 07 mar.2012.
- FERRAZ, M. A., CERQUEIRA, M. M. O. P., & SOUZA, M. R. Evaluation of *Enterobacteriaceae* in the powdered Milk production chain using both traditional (ISO 21528:2) and rapid (3MTTM PetrifilmTM) methods. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 373-376, 2010.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in food 6 - Microbial Ecology of food commodities**, 2^a ed. New York, 2005.
- LAIR, D. T.; GAMBREL-LENARZ, S. A.; SCHER, F. M.; GRAHAM, T. E.; REDDY, R. Microbiological Count Methods. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, American Public Health Association: Washington, 2004, p.153-185.
- LEITE, T. C.; DELMO, S. V.; DUTRA, P. B. Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade a atualidade. **Química Nova**, v.29, n. 4, p. 876-880, 2006.
- MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade do leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008.
- MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, B. P. D. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p.173-182, 2010.
- MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**, American Public Health Association: Washington, 2001, p. 331-341.
- MORAIS, C. R.; FUENTEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG, A.; VALENTE, P.; CORÇÃO,

- G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica do leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p.259-264, 2005.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras Brasileiras: Perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.
- ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos**, v. 2. Alimentos de Origem Animal. Porto Alegre: Artmed, 2005, 279 p.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27, n.2, p. 293-300, 2004.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade Microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.
- ROSSI JÚNIOR, O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CARDOZO, M. V.; CORTEZ, A. L. L. Estudo das características microbiológicas do Leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 27-32, 2006.
- ROMA JUNIOR, L. C.; MONTOYA, J. F. G.; MARTINS, T. T.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.6, p. 1411-1418, 2009.
- SANTOS, M. V. **A melhoria da qualidade do leite e a IN 51**. Inforleite, São Paulo, 2011.
- SILVA, Z. N.; CUNHA, A. S.; LINS, M. C.; CARNEIRO, L. A. M.; ALMEIDA, A. C. F.; QUEIROZ, M. L. P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized Milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n.4, p.375-379, 2001.
- SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A.C. S.; MELO, R. O.; OLIVEIRA, J. O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p. 226-230, 2008.
- SILVEIRA, I. A., CARVALHO, E. P., TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite cru refrigerado: Uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 21-27, 2000.

STATSOFT, INC, STATISTICA (Data Analysis Software System), version 8, www.statsoft.com. 2004.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.753-760, 2008.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ E SISTEMA TEMPO® NA CONTAGEM DE MICRORGANISMOS EM LEITE PASTEURIZADO

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ E SISTEMA TEMPO® NA CONTAGEM DE MICRORGANISMOS EM LEITE PASTEURIZADO

Andréia Cirolini¹; Andressa Mara Baseggio²; Marília Miotto¹; Roberta Juliano Ramos³; Paulo José Ogliari⁴; Cleide Rosana Werneck Vieira^{5*}

¹ Estudantes de Pós - graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC

² Bolsista de Iniciação Científica da UFSC

³ Prof. do Centro Universitário Estácio de Sá de Santa Catarina

⁴ Prof. do Departamento de Informática de Estatística da UFSC

⁵ Prof. do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFSC.

* Autor para correspondência: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rodovia Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: deiacirolini@yahoo.com.br

Artigo submetido à revista: Journal of Food Quality

RESUMO

Inovadores métodos microbiológicos tem sido desenvolvidos e comercializados, com várias vantagens, mas é preciso garantias sobre sua *performance*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o sistema Petrifilm™ e o sistema TEMPO® em relação a metodologia convencional de contagem de microrganismos em leite pasteurizado. Foram analisadas 141 amostras de leite pasteurizado com ensaios de mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli*. Uma alta correlação foi encontrada entre as metodologias utilizadas para o ensaio de Coliformes a 35°C. Todavia, nos ensaios de mesófilos aeróbios, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* os coeficientes de correlação foram baixos. As médias não apresentaram diferença estatística significativa entre os três métodos para contagem de Coliformes a 35°C, porém na contagem de mesófilos aeróbios, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* as médias apresentaram diferenças estatísticas significativas. Pode-se concluir que o sistema Petrifilm™ e o sistema TEMPO® mostraram resultados satisfatórios para o ensaio de Coliformes a 35°C em leite pasteurizado e uma baixa *performance* para mesófilos aeróbios, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli*.

Palavras-chave: leite pasteurizado, métodos alternativos, microrganismos, metodologia convencional

ABSTRACT

New microbiological methods have been developed and commercialized. Besides presenting several advantages, the performance of the methods must be guaranteed. The aim of the present work was to evaluate the PetrifilmTM and TEMPO[®] systems compared to the conventional method for counting microorganisms in pasteurized milk. 141 samples of pasteurized milk were analyzed by counting of mesophilic aerobic bacteria, Coliforms at 35°C, Coliforms at 45°C and *Escherichia coli* microorganism. High correlation was found between the methods for counting Coliforms at 35°C, but low correlation for mesophilic aerobic bacteria, Coliforms at 45°C and *Escherichia coli*. No significant statistical difference was found among the three methods for counting Coliforms at 35°C, but for mesophilic aerobic bacteria, Coliforms at 45°C and *Escherichia coli*. PetrifilmTM and TEMPO[®] systems presented satisfactory results for Coliforms at 35°C in pasteurized milk but low performance for mesophilic aerobic bacteria, Coliforms at 45°C and *Escherichia coli*.

Key-words: pasteurized milk, alternative methods, microorganisms, conventional methods.

1. INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos no leite pasteurizado pode ser atribuída à inadequada pasteurização ou a contaminação pós-pasteurização (ICMSF, 2005). Com o propósito de reduzir riscos de contaminação ao consumidor programas de controle de qualidade microbiológica estão sendo aplicados em toda a cadeia de produção alimentar (MALORNY et al., 2003). O ensaio microbiológico vem sendo adotado há um longo tempo como uma forma de controle e monitoramento da matéria prima e do produto industrializado, garantindo a segurança microbiológica do alimento e desta forma não oferecendo riscos a saúde do consumidor (NERO et al., 2000)

Embora os métodos convencionais de enumeração e detecção de microrganismos apresentem a sua sensibilidade bem documentada, o tempo necessário para obter resultados é muitas vezes longo demais para as necessidades da indústria (REITER et al., 2010). Diante desta problemática, novos métodos vêm sendo desenvolvidos como alternativa aos métodos convencionais com o objetivo de oferecer resultados mais rápidos e a simplificação do processo analítico (TAVOLARO et al., 2005)

Um dos métodos alternativos aplicados para contagem de microrganismos em alimentos é o sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA), que consiste em um fino filme plástico que carrega o meio de cultura. Sua base é recoberta de nutrientes desidratados e géis hidrossolúveis a frio e no filme superior contém agentes geleificantes e um corante indicador (NERO; BELOTI; BARROS, 2000; JASSON et al., 2010).

Outro método alternativo empregado para contagem de microrganismos é o sistema TEMPO® (Biomérieux S.A.), baseado na técnica do NMP, o sistema consiste em um cartão e um frasco com meio de cultura desidratado e um indicador fluorescente. O meio inoculado é transferido automaticamente pelo TEMPO® Preparo para um cartão contendo 48 poços de três diferentes volumes. O microrganismo presente hidrolisa o substrato do meio de cultura e, durante a incubação, produz um sinal fluorescente, o qual é detectado pelo TEMPO® Leitor que calcula o número de poços positivos e expressa os resultados em UFC/mL (OWEN; WILLIS; LAMPH, 2010, TORLAK; AKAN; GOKMEN, 2008).

No entanto, variações regionais da microbiota ou da matriz alimentícia ou algumas características intrínsecas do alimento podem influenciar o desempenho dos métodos alternativos (TAVOLARO et al., 2005; CASAROTTI; PAULA; ROSSI, 2007). Beloti et al. (2002) destacam que a microbiota do leite pasteurizado produzido em diferentes regiões do Brasil pode influenciar significativamente no desempenho de alguns métodos alternativos.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA) e o sistema TEMPO® (Biomérieux S.A.) com a metodologia convencional de contagem de microrganismos em leite pasteurizado produzido em laticínios do Estado de Santa Catarina - Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram coletadas 141 amostras (sacos de um litro) de seis (6) laticínios com sistema de Inspeção Federal (SIF), do estado de Santa Catarina-Brasil no período entre dezembro de 2009 e novembro de 2011. A coleta foi realizada por um fiscal sanitário do Ministério da Agricultura (SFA/SC), responsável pela fiscalização da indústria.

As amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, a fim de manter a temperatura inferior a 4°C (BRASIL, 2002). Após, foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foi realizada a verificação da temperatura com termômetro digital (Wertern®).

2.2. Análises Microbiológicas

O conteúdo das embalagens foi homogeneizado por agitação manual. Os sacos antes de serem abertos foram limpos com algodão e desinfetados com álcool 70%. Foram realizadas as diluições decimais, utilizando-se água peptonada (0,1%) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) (BRASIL, 2003).

Foram realizados ensaios de contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* pela metodologia convencional e pelo sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA) e contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C e *Escherichia coli* pelo sistema TEMPO® (Biomérieux S.A.).

2.2.1 Metodologia Convencional

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios foi realizada de acordo com Laird et al (2004). Alíquotas de 1,0 mL das diluições foram transferidas para placas de petri em duplicata e adicionado ágar de contagem em placa (PCA - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) previamente fundido e mantido a 44°C-46°C em banho-maria. As placas foram incubadas a $32^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Os ensaios de Coliformes a 35°C e *Escherichia coli* foram realizadas de acordo com Davidson, Roth e Gambrel-Lenarz (2004) e Coliformes a 45°C de acordo com Brasil (2003). Alíquotas de 1,0 mL das diluições foram transferidas para placas de petri em duplicata e adicionado Ágar Vermelho Violeta Bile (VRBA - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e incubadas $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Realizou-se a contagem das colônias vermelhas de 5 mm. Três a cinco colônias foram transferidas para tubos de Caldo Verde Brilhante 2% Lactose (BVB - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e para tubos com Caldo *Escherichia coli* (EC - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) para confirmação de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C. Os tubos de BVB foram incubados a 35°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$)

por 48 horas e os tubos de EC em banho-maria a 45°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) por 48 horas. A partir dos tubos de EC, com turvação e produção de gás, foi realizado esgotamento em placas de Ágar Eosina Azul de Melileno (EAM - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e incubadas a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24 horas. Colônias típicas de *Escherichia coli* (verde brilhantes) foram submetidas à série bioquímica: Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato (IMViC). O resultado final de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C é expresso a partir da positividade dos tubos, caracterizada pela produção de gás em cada tubo individualmente. As contagens de *Escherichia coli* foram feitas a partir da confirmação das colônias isoladas no EAM na série bioquímica do IMViC, também expressos pela combinação de isolados positivos.

2.2.2 Sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA)

Pelo sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA), as placas AC, para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, as placas EC para contagem de Coliformes a 35°C e *Escherichia coli* e as placas CC para contagem de Coliformes a 45°C foram inoculadas com 1,0 mL da amostra. As placas AC foram incubadas a 35°C por 48 horas e após selecionaram-se, para a contagem, colônias vermelhas (MORTON, 2001). As placas EC foram incubadas a 35°C por 24 horas e decorrido o tempo de incubação, realizou-se à leitura das placas que apresentaram colônias vermelhas associadas com bolhas de gás, indicativo de Coliformes a 35°C. Após a leitura, as placas foram incubadas por mais 24 horas para a confirmação de *Escherichia coli*, representada por colônias azuis e com gás. Para a contagem de coliformes a 45°C as placas CC foram incubadas a 44°C por 24 horas, e após o período de incubação, foi realizada a leitura das colônias vermelhas associadas com bolhas de gás (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

2.2.3. Sistema TEMPO® (Biomérieux S.A)

Uma alíquota dos diferentes níveis de inóculos foi transferida para os frascos do TEMPO® (Biomérieux S.A.), estas alíquotas foram diluídas 1/4, 1/40 ou 1/1400 dependendo da faixa presumível de microrganismos na amostra de acordo com o fabricante (por exemplo, 1 mL da amostra é adicionado a 3 mL de meio de cultura específico para obter um quarto da diluição). Esse volume foi automaticamente transferido para um cartão contendo 48 poços de três diferentes volumes (16 x 225, 16 x 22,5, 16 x 2,25µL), usando o Tempo Preparo®. Após

incubação a 32°C por 48 horas para contagem de mesófilos e 35°C por 24 horas para a contagem de Coliformes a 35°C e *Escherichia coli*, realiza-se a leitura no equipamento Tempo leitor®. Os resultados são analisados automaticamente pelo sistema de *software* que determina quais os poços foram positivos. O número de poços positivos obtidos em relação ao volume dos poços e da diluição das amostras, permite a enumeração automática dos resultados em UFC/mL (BIOMERIEUX, 2012).

2.3 Análise Estatística

Os valores obtidos foram convertidos em forma logarítmica e, na sequência, os resultados foram submetidos à análise e variância (Anova) e teste de Tukey e à análise de regressão. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statística® 8.0 (STATSOFT, INC, STATISTICA). Para fins de cálculos estatísticos, sempre que os resultados obtidos foram <1UFC/mL, estes resultados foram substituídos pelo número imediatamente inferior, ou seja, 0,9UFC/mL.

3. RESULTADOS

Os resultados da análise de variância estão apresentados na Tabela 1. Os dados indicam que não houve diferença estatística entre os três métodos analisados (método convencional, sistema Petrifilm™ e sistema Tempo®) para contagem de Coliformes a 35°C, porém na contagem de mesófilos aeróbios, Coliformes a 45°C as médias foram estatisticamente diferentes nos três métodos analisados. Na análise de *Escherichia coli* os resultados indicaram que não houve diferença estatística entre o sistema Petrifilm™ e o sistema Tempo®, porém os resultados foram estatisticamente diferentes da metodologia convencional.

Tabela 1. Contagens médias em log₁₀UFC/mL de mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* através do método convencional, sistema Petrifilm™ e sistema TEMPO® em amostras de leite pasteurizado provenientes de laticínios do estado de SC

Microrganismo	Método Convencional	Sistema Petrifilm™	Sistema Tempo®
Mesófilos aeróbios	4,64 ^a ±0,86	3,23 ^b ±1,21	3,59 ^c ±1,06
Coliformes a 35°C	0,62 ^a ±1,20	0,50 ^a ±1,03	0,59 ^a ±1,20
Coliformes a 45°C	0,04 ^a ±0,36	0,19 ^b ±0,64	-*
<i>Escherichia coli</i>	-0,01 ^a ±0,18	-0,04 ^b ±0,05	-0,04 ^b ±0,05

Médias acompanhadas por letras iguais, na mesma linha não apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5%

*Análise não disponível pelo sistema Tempo®

Os resultados da análise de regressão das contagens de mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* realizadas entre o método convencional e os métodos alternativos são apresentados na Tabela 2.

Observa-se que os resultados da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios mostraram uma baixa correlação entre a metodologia convencional e o sistema Petrifilm™, entre a metodologia convencional e o sistema o TEMPO® e entre as metodologias alternativas.

Os resultados da contagem de Coliformes a 35°C mostraram uma alta correlação entre as metodologias analisadas. Enquanto para os Coliformes a 45°C a análise de regressão mostrou uma baixa correlação entre o método convencional e o sistema Petrifilm™.

Em relação a contagem de *Escherichia coli*, os resultados mostraram uma baixa correlação entre a metodologia convencional e o sistema Petrifilm™, entre a metodologia convencional e o sistema o TEMPO® e uma moderada correlação entre as metodologias alternativas.

Tabela 2 – Coeficiente de Correlação (r) obtido pelo ensaio de mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* (Log UFC/mL) pelo método convencional frente ao sistema Petrifilm™ e o sistema TEMPO® e entre os métodos alternativos em amostras de leite pasteurizado provenientes de laticínios do estado de SC

Comparação de métodos de contagem	Mesófilos aeróbios	Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C	<i>Escherichia coli</i>
Convencional x Petrifilm™	0,28	0,94	0,25	0,53
Convencional x Tempo®	0,58	0,83	-*	0,55
Petrifilm™ x Tempo®	0,58	0,88	-*	0,72

*Análise não disponível pelo sistema Tempo®

Também pode-se visualizar na Tabela 3 o tempo (em horas) para o resultado final entre as metodologias utilizadas para o ensaio de mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli*. Observa-se que o ensaio de mesófilos aeróbios não houve diferença na duração da execução dos ensaios pelos diferentes métodos. Já no

ensaio de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C observa-se que a metodologia convencional necessita de 48 horas a mais que as metodologias alternativas para a obtenção do resultado final. Em relação ao ensaio de *Escherichia coli* observa-se que o sistema TEMPO® é o método mais rápido para conclusão do ensaio, seguido do sistema Petrifilm™ com 48 horas e pela metodologia convencional.

Tabela 3. Tempo (em horas) para o resultado final do ensaio de mesófilos aeróbios, Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* pela metodologia convencional, sistema Petrifilm™ e sistema Tempo®

Microrganismo	Método Convencional	Sistema Petrifilm™	Sistema Tempo®
Mesófilos aeróbios	48	48	48
Coliformes a 35°C	72	24	24
Coliformes a 45°C	72	24	-*
<i>Escherichia coli</i>	168	48	24

*Análise não disponível pelo sistema Tempo®

4. DISCUSSÃO

Como pode se observar na Tabela 1, o leite pasteurizado utilizado em nosso estudo apresentou uma média elevada de microrganismos mesófilos identificados pela metodologia convencional. Na metodologia convencional não foi utilizado o corante indicador, cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), para a contagem de colônias como as metodologias alternativas utilizam. Beloti et al. (2009) ressalta que microrganismos gram positivos, como *Micrococcus*, *Coryneforms* e alguns *Bacillus* presentes no leite cru, quando submetidos a pasteurização e sobrevivem, podem afetar a capacidade de reduzir o TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) pela injúria produzida pelo calor o qual foram submetidos. Desta forma estas bactérias não são detectadas quando são utilizados métodos laboratoriais baseados na formação de colônias vermelhas como é o caso do sistema Petrifilm™.

A placa de Petrifilm™ é uma alternativa conveniente, fácil de usar que utiliza o corante indicador, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), para a contagem de colônias, este corante é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido pela enzima mitocondrial

succinato-desidrogenase do microrganismo, pela formação do precipitado formazán (BELOTI et al., 1999).

Resultados obtidos por Freitas, Nero e Carvalho (2009) em leite pasteurizado, não encontraram diferença entre a contagem obtida pelo Petrifilm™ e a metodologia convencional quando incubados por 72 horas, sugerindo que este seria o período necessário para o desenvolvimento adequado de colônias de microrganismos com baixa capacidade de reduzir o TTC em leite pasteurizado.

Baixas correlações encontradas entre os diferentes métodos na contagem de microrganismos mesófilos aeróbios foram semelhantes aos resultados da correlação obtida por Beloti et al. (2002) quando analisaram microrganismos mesófilos aeróbios em diferentes tipos de leite pasteurizado, a correlação entre o método convencional e o Petrifilm™ foi de $r=0,69$ para o leite pasteurizado. Estes autores também observaram que a performance do sistema Petrifilm™ reduziu com o decréscimo da qualidade microbiológica do leite pasteurizado.

A baixa correlação encontrada entre a metodologia convencional e o sistema TEMPO® na contagem de microrganismos mesófilos pode ter sido afetada pela baixa atividade enzimática das bactérias presentes no leite pasteurizado, semelhante ao ocorrido no sistema Petrifilm™, onde as bactérias do leite não reduziram o TTC. No sistema TEMPO® TVC (contagem de microrganismos mesófilos aeróbios) o princípio de detecção baseia-se na multiplicação do microrganismo e na reação fluorescente produzido pela molécula 4-Metil umbelliferone (4MU). O crescimento do microrganismo hidrolisa o meio de cultura durante a incubação, produzindo, desse modo, um sinal fluorescente (CROWLEY et al., 2009).

Zitz et al. (2011) realizaram um estudo testando o sistema TEMPO® para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (TEMPO® TVC) com amostras de queijo contaminadas artificialmente, o método mostrou uma grande variabilidade nos valores encontrados com o sistema TEMPO® TVC comparados com a contagem em placas.

A diferença estatística encontrada entre os três métodos analisados enfatizam os baixos resultados de correlação encontrados pela análise de regressão. Crowley et al. (2009).) também realizaram um estudo comparativo do sistema TEMPO® TVC (contagem de mesófilos aeróbios) e o método AOAC 966.23 em 15 lotes de alimentos, encontraram diferença estatística em três lotes analisados.

Pode-se observar que o ensaio de mesófilos aeróbios, o sistema Petrifilm™ e sistema TEMPO® não apresentaram diferença no tempo de obtenção do resultado final quando comparado com a metodologia

convencional (Tabela 3), no entanto, deve se levar em consideração que essas metodologias alternativas apresentam uma melhor praticidade laboratorial, pela redução do material utilizado no laboratório, preparo de meios de cultura e do volume de resíduos gerados durante o ensaio.

Resultados indicaram que não houve diferença estatística entre as metodologias testadas para o ensaio de Coliformes a 35°C. Divergindo do estudo realizado por Raybaudi et al. (2005) na detecção de Coliformes, em amostras de leite pasteurizado, comparando o sistema Petrifilm™, método do Número Mais Provável e um método proposto por Shertha and Sinha em 1990 usando “violet red bile” (VRB) os quais encontraram uma significativa diferença estatística.

As placas Petrifilm™ de contagem de Coliformes possuem como meio de cultura seletivo, o ágar vermelho violeta bile (VRB) e o corante indicador tetrazólio (TTC), que formam colônias vermelhas pela redução do TTC e bolhas de gás oriundas da fermentação da lactose (NERO; BELOTI; BARROS, 2000). O sistema TEMPO® para contagem de Coliformes a 35°C baseia-se na acidificação do meio de cultura provocada pela fermentação do carboidrato, resultando na extinção da fluorescência em tubos de reação positiva (JOHSON; MILLS; BEZZOLE, 2009).

Também em relação aos Coliformes a 35°C, coeficientes de correlação menores 0,76, 0,77 e 0,79 foram obtidos em amostras de hortaliças, queijo e linguiças respectivamente, comparando o sistema Petrifilm™ e a técnica convencional de tubos múltiplos (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006), no entanto, diferente da técnica convencional de contagem em placas utilizado em nosso estudo.

Também pode se observar uma grande vantagem das metodologias alternativas quando comparado com a metodologia convencional na contagem de Coliformes a 35°C em relação a redução do tempo de emissão do resultado final, contribuindo significativamente para tomada de decisões sobre o produto. Kunicka (2007) também destaca a redução no tempo das análises usando o sistema Tempo®.

Em relação à contagem de Coliformes a 45°C a análise de variância mostrou haver uma diferença estatística significativa entre a metodologia convencional e o sistema Petrifilm™. A análise de regressão também mostrou uma baixa correlação entre as metodologias. Como destaca Ortiz e Rios (2006), a empresa 3M™ tem projetado placas para a enumeração de Coliformes e *Escherichia coli*, que receberam a aprovação da Association Official Analytical Chemists (AOAC), Association Française de Normalização (AFNOR) e pelo Comité Nórdico de Análises Alimentares (NMKL). Porém, ainda não

desenvolveram placas específicas para contagem de Coliformes a 45°C, a 3M e AFNOR sugerem o uso de placas de Coliformes a 35°C para encontrar Coliformes a 45°C incubando as placas a 44°C.

As placas utilizadas neste estudo para a contagem de Coliformes a 45°C foram placas Petrifilm™ CC, para contagem de Coliformes, sendo incubada a temperatura de 44°C, conforme método validado pela Association Française de Normalização (AFNOR). As placas de contagem de coliformes possuem como meio de cultura base o ágar vermelho violeta bile (VRB), corante indicador 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e agentes geleificantes. A característica das placas de coliforme são colônias vermelhas pela redução do TTC e bolhas de gás associadas a estas colônias provocadas pela fermentação da lactose (NERO; BELOTI; BARROS, 2000).

Observa-se que as análises de variância não mostraram diferença estatística entre as metodologias alternativas para contagem de *Escherichia coli*. O sistema de Petrifilm™ e o sistema TEMPO® apresentam o mesmo princípio de detecção, baseado na atividade glicoronidásica da *Escherichia coli*, no entanto, as metodologias alternativas foram estatisticamente diferentes da metodologia convencional. O método convencional é baseado na capacidade do microrganismo fermentar a lactose com produção de gás em 48 horas, degradar ou não o triptofano, fermentar glicose, detectar a presença de acetimetilcarbinol ou acetoina produzida pelo metabolismo de certos microrganismos e utilizar o citrato como fonte de carbono (padrões IMViC +++- Biotipo I ou IMViC -+++ Biotipo II) (DAVIDSON; ROTH; GAMBREL-LENARZ, 2004).

As placas de Petrifilm™ utilizadas na contagem de *Escherichia coli* são as placas de Coliformes, mas que necessitam de 48 horas de incubação. Estas placas possuem como meio de cultura base o ágar vermelho violeta bile (VRB), corante indicador 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), agentes geleificantes além do 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glicoronideo (BCIG), que indica a atividade glicoronidásica da *E. coli*. Em torno de 97% das cepas de *E. coli* produzem a enzima glucuronidase que, ao degradar ao BCIG, libera o indicador que torna a colônia azul, junto com bolhas de gás produzidas pela fermentação da lactose (NERO; BELOTI; BARROS, 2000)

O princípio de detecção do sistema TEMPO® EC (contagem de *Escherichia coli*) baseia-se na multiplicação do microrganismo e na reação fluorescente produzido pela molécula 4-Metil umbelliferone (4MU). O meio de cultura seletivo contendo o 4-metilumbelliferil-β-D-glicoronideo (MUG) é hidrolizado pela enzima β-glicoronidase

produzida pela *Escherichia coli* emitindo um sinal fluorescente (CROWLEY et al., 2010).

Em estudo desenvolvido por Crowley et al. (2010) em leite pasteurizado artificialmente contaminado com 3 níveis de contaminação do inóculo, comparou o sistema TEMPO® EC e a metodologia oficial da AOAC 966.24 para identificação de *Escherichia coli*, os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre os métodos no nível de contaminação médio e alto, porém no nível de contaminação baixo, os resultados apresentaram uma diferença estatística significativa, semelhante ao resultado encontrado em nossos estudo.

Baixas correlações foram encontradas entre os métodos alternativos e a metodologia convencional na contagem de *Escherichia coli*, semelhante ao trabalho desenvolvido por Cavalheri; Vieira; Reibnitz (2000) em amostras de leite pasteurizado, o sistema Petrifilm™ foi inadequado na detecção de *Escherichia coli* e mostrou não ser seletivo, permitindo o crescimento de microbiota acompanhante, apresentando altas contagens. Isso, no entanto, não ocorreu em nosso estudo, o observado foi que as metodologias alternativas não tiveram uma boa recuperação da *Escherichia coli* comparada com a contagem convencional. Embora apresentando valores de média pequenos (Tabela 2), a identificação de *Escherichia coli* foi maior na metodologia convencional do que nos métodos alternativos.

Coefficientes mais elevados (0,95) foram encontrados por Torlak, Akan e Gokmen (2008), em estudo com amostras de queijo naturalmente contaminada pelo sistema TEMPO® (Biomérieux S.A.) e metodologia ISO 16649 2001.

Zitz et al. (2011) realizaram um trabalho testando o sistema TEMPO® para contagem de *Escherichia coli* (TEMPO® EC) com amostras de queijo contaminadas artificialmente com *Escherichia coli*, concluíram que TEMPO® EC mostrou-se mais preciso que o TEMPO® TC.

Também foi observado que em relação ao ensaio de *Escherichia coli* o sistema TEMPO® é o método mais rápido para a emissão do resultado final, seguido do sistema Petrifilm™ e da metodologia convencional.

Pode-se concluir que o sistema Petrifilm™ e o sistema TEMPO® mostraram resultados satisfatórios para o ensaio de Coliformes a 35°C em leite pasteurizado. Resultados com uma baixa performance foi obtida para mesófilos aeróbios, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli*. Desta forma, o sistema Petrifilm™ e o sistema TEMPO® podem ser uma alternativa à metodologia convencional para

ensaio de Coliformes a 35°C em leite pasteurizado, visto a boa correlação entre os resultados, somado a facilidade operacional e a redução do tempo gasto no ensaio microbiológico por estes sistemas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FREITAS, J. C.; NERO, L. A.; SOUZA, J. A.; SANTANA, E. H. W.; FRANCO, B. D. G. M. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bactéria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 137-140, 1999.

BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; PACHEMSHY, J.A.S.; SANTANA, E.H.W.; FRANCO, B.D.G.M. Quality of pasteurized milk influences the performance of ready-to-use systems for enumeration of aerobic microorganisms. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 413-418, 2002.

BIOMERIEUX, 2012. **Quality Indicators Enumeration**. Disponível em: <http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industry-microbiology/dynPage?open=NDY_IND_FDA_PRD&doc=NDY_FDA_PRD_G_PRD_NDY_1&pubparams.sform=0&lang=en>. Acesso em: 18 nov, 2012.

BRASIL. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Instrução Normativa n° 62 de 26 de agosto de 2003.

CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n. 3, p. 278-286, 2007.

CROWLEY, E. S., BIRD P. M., TORONTALI M. K, AGIN J.R., GOINS D. G. TEMPO®TVC for the enumeration of Aerobic Mesophilic Flora in Foods: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**. v.92, n.1, p.165-174, 2009.

CROWLEY, E., BIRD P., TORONTALI M., GOETZ K., AGIN J., GOINS D. TEMPO®EC for the enumeration of *Escherichia coli* in

Foods: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**. v. 93, n.2, p.576-586, 2010.

CAVALHERI, N. A.; VIEIRA, C.R.W. ; REIBNITZ, M. G. R. . Avaliação dos Métodos Colilert, Fluorocult e Petrifilm na determinação de *Escherichia coli* em leite pasteurizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 55, p. 1-7, 2000.

DAVIDSON, P. M.; ROTH, L. A. GAMBREL-LENARZ, S. A. Coliform and other Indicator Bacteria. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, American Public Health Association: Washington, 2004, p.187-203.

FREITAS, R.; NERO, L.A.; CARVALHO, A.F. Enumeration of mesophilic aerobes in milk: Evaluation of standard official protocols and Petrifilm aerobic count plates. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3069-3073, 2009.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in food 6 - Microbial Ecology of food commodities**, 2^a ed. New York, 2005.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**, v.27, n.6, p.710-730, 2010.

JOHNSON, R. L.; MILLS, J. C.; BEZZOLE, L. Biomerieux TEMPOR CC Test Granted PTM Status, **Journal of AOAC Internacional**, v. 1, p. 40-43, 2009.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, American Public Health Association: Washington, 2001, p.69-82.

KUNICKA, A. Health and Medicine. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p.69-72, 2007.

LAIR, D. T.; GAMBREL-LENARZ, S. A.; SCHER, F. M.; GRAHAM, T. E.; REDDY, R.. Microbiological Count Methods. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, American Public Health Association: Washington, 2004, p.153-185.

MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RADSTROM, P.; COOK. N.; WAGNER, M.;

HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

- MORTON, D.R. Aerobic Plate Count. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, American Public Health Association: Washington, 2001, p.63-67.
- NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos Rápidos e Automatizados para Enumeração de Microrganismos Indicadores em Leite – Utilização no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n.1, p. 115-126, 2000.
- ORTIZ L, Miriam C e RIOS DE S, Manuela. Comparación de los métodos Petrifilm™ coliformes y Número Más Probable (NMP) para la determinación de coliformes fecales en muestras de queso blanco. **Revista Del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, v.37, n.2, p.15-18, 2006.
- OWEN, M.; WILLIS, C.; LAMPH, D. Evaluation of the TEMPO® most probable number technique for the enumeration of *Enterobacteriaceae* in food and dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, n. 109, p. 1810-1816, 2010.
- RAYBAUDI, R. M.; ZEA, Z. A.; CURINI, G.; MARTINEZ, A. J. Y. Comparison of a Rapid Procedure with the MNP and Petrifilm Methods for the detection of Coliforms in Pasteurized Milk. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.13, p.11-18, 2005.
- REITER, M. G.; LÓPEZ, C.; JORDANO, R.; MEDINA, L. M. Comparative Study of Alternative Methods for Food Safety Control in Poultry Slaughterhouses. **Food Analytical Methods**, v. 3, p. 253-260, 2010.
- SILVA M.P., CAVALLI D. R., OLIVEIRA T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n. 2, p. 352-359, 2006.
- STATSOFT, INC, STATISTICA (Data Analysis Software System), version 8, www.statsoft.com. 2004.
- TAVOLARO, P.; FERRATI, A. R.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 295-300, 2005.
- TORLAK, E.; AKAN, I.M.; GÖKMEN, M. Comparison of TEMPO® EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. **Letters in Applied Microbiology**. v. 47, p. 566–570, 2008.
- ZITZ, U.; DOMING, K. J.; HOEHL, A.; WEISS, H.; WILRICH, P. T.; KNEIFEL, W. Evaluation of three applications of a semi-automated most-probable-number method for the assessment of microbiological

parameters in dairy products. **Accreditation and Quality Assurance**. v. 16, p. 299-309, 2011.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ EB, TEMPO® EB COM O MÉTODO ISO 21528:2 PARA CONTAGEM DE *Enterobacteriaceae* EM LEITE

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ EB, TEMPO® EB COM O MÉTODO ISO 21528:2 PARA CONTAGEM DE *Enterobacteriaceae* EM LEITE

Andréia Cirolini¹; Marília Miotto¹; Fernanda Morgana Machado¹; Helen Silvestre da Silva¹; Paulo José Ogliari²; Cleide Rosana Werneck Vieira^{3*}

¹ Estudantes de Pós - graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC

² Prof. do Departamento de Informática de Estatística da UFSC

³ Prof. do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFSC.

* Autor para correspondência: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rodovia Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: deiacirolini@yahoo.com.br

Artigo aceito pela revista: *Brazilian Journal of Microbiology* (em anexo o aceite)

RESUMO

O desenvolvimento de técnicas alternativas de ensaios microbiológicos está surgindo para atender as necessidades atuais de se obter resultados rápidos no processo de fabricação de alimentos, mas é importante que estas metodologias sejam avaliadas para cada aplicação. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o sistema Petrifilm™ EB e o sistema TEMPO® EB com o método ISO 21528:2 para contagem *Enterobacteriaceae* em amostras de leite. Foram analisadas a microflora de 141 amostras de leite pasteurizado, 15 amostras de leite pasteurizado artificialmente contaminado e 15 amostras de leite UHT artificialmente contaminadas. Quando avaliado o Petrifilm™ EB e o método ISO 21528:2 a análise de regressão mostrou uma alta correlação nas amostras analisadas, sendo $r=0,90$ para a microflora do leite pasteurizado, $r=0,98$ para o leite pasteurizado artificialmente contaminado e $r=0,99$ para o leite UHT artificialmente contaminado. Na avaliação do sistema TEMPO® EB e o método ISO 21528:2 a correlação também foi significativa nas amostras analisadas, com $r=0,86$ para o leite pasteurizado naturalmente contaminado, $r=0,96$ para o leite artificialmente contaminado e $r=0,99$ para o leite UHT artificialmente contaminado. Não foi observada diferença estatística entre os três métodos analisados com leite pasteurizado e UHT artificialmente contaminados nos três níveis de inóculo. Em conclusão, o sistema

Petrifilm™ EB e o sistema TEMPO® EB podem ser uma alternativa ao método ISO 21528:2 para ensaio de *Enterobacteriaceae* em leite, visto a facilidade operacional e a redução do tempo gasto no ensaio microbiológico por estes sistemas.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*, leite, métodos alternativos, ISO 21528-2:2004, contagem.

ABSTRACT

The development of alternative microbiological techniques is driven by the necessity to meet the current needs to deliver rapid results in the manufacturing process of foods, but it is important that these methods be evaluated for each application. The objective of the present study was to assess the Petrifilm™ EB and the TEMPO® EB systems with ISO 21528-2:2004 for the count of *Enterobacteriaceae* in pasteurized and UHT milk samples. We analyzed the microflora of 141 pasteurized milk samples, 15 samples of artificially contaminated pasteurized milk and 15 samples of artificially contaminated UHT milk. Investigation of the method Petrifilm™ EB and ISO 21528:2 regression analysis showed a high correlation in the samples, $r=0.90$ for the microflora of pasteurized milk, $r=0.98$ for artificially contaminated pasteurized milk and $r=0.99$ for the artificially contaminated UHT milk. In evaluating the system TEMPO EB ® method and ISO 21528:2 correlation was also significant in the analyzed samples, with $r=0.86$ for the microflora of pasteurized milk, $r=0.96$ for artificially contaminated pasteurized milk and $r=0.99$ for artificially contaminated UHT milk. No statistically significant differences were observed between the three methods conducted to analyze artificially contaminated pasteurized and UHT milk at three inoculum levels. In conclusion, the Petrifilm™ EB system and the TEMPO® EB system may be an alternative to the ISO 21528-2:2004 for the *Enterobacteriaceae* assay for milk as because of the ease-of-operation and the time reduction achieved for conducting the microbiological assay using these systems.

Key-words: *Enterobacteriaceae*, milk, alternative methods, ISO 21528-2:2004, count

1. INTRODUÇÃO

As *Enterobacteriaceae* são uma grande família de bactérias Gram-negativas, em forma de bastonete, anaeróbias facultativas. São usadas, há anos, como indicador de qualidade microbiológica e como

índice de segurança dos alimentos na Europa. A presença de *Enterobacteriaceae* geralmente indica problemas com a higiene dos processos, tais como tratamento térmico inadequado ou contaminação pós-processo a partir de matérias-primas ou o ambiente (KORNACKI; JOHNSON, 2001; OWEN; WILLIS; LAMPH, 2010).

Na União Européia e em outras nações desenvolvidas, *Enterobacteriaceae* é uma análise obrigatória para muitos tipos de produtos alimentares. Enquanto que, no Brasil, um dos maiores produtores de leite e produtos lácteos no mundo, a análise de *Enterobacteriaceae* não é necessária para estes alimentos, apenas os Coliformes e *Salmonella* sp são obrigatórios. Isso torna difícil a capacidade de inserção dos produtos brasileiros no mercado global, que é dependente das normas internacionais, tais como a qualidade microbiológica (FERRAZ; CERQUEIRA; SOUZA, 2010).

Tradicionalmente, os métodos para enumeração de bactérias por plaqueamento em ágar têm sido usados na avaliação microbiológica, no entanto, novos métodos têm sido desenvolvidos como alternativa aos métodos convencionais baseados na tecnologia de indicadores cromogênicos ou fluorogênicos, oferecendo resultados mais rápidos, economia de espaço e materiais, aumentando a produtividade laboratorial quando comparados às técnicas convencionais (BELOTI et al., 2003; CASAROTTI; PAULA; ROSSI, 2007)

Um dos métodos alternativos empregados para contagem de *Enterobacteriaceae* em alimentos é o sistema Petrifilm™ EB (3M Company, St. Paul, MN, EUA), consiste em um sistema pronto para o uso, constituído por um sistema de filme duplo. O filme inferior é recoberto de nutrientes desidratados e géis hidrossolúveis a frio e o filme superior contém agentes geleificantes e um corante indicador. A placa de Petrifilm™ EB é uma alternativa rápida para a contagem de *Enterobacteriaceae* usando como meio de cultura o vermelho violeta bile glicose (VRBG) e o indicador tetrazólio (TTC), com incubação a 35°C por 24 horas (NERO; BELOTI; BARROS, 2000; KORNACKI; JOHNSON, 2001; JASSON et al., 2010)

Outro método alternativo é sistema TEMPO® (Biomérieux S.A.), um dos mais recentes sistemas automatizados de contagem de indicadores da qualidade microbiológica de alimentos. O sistema consiste em um cartão e um vial contendo o meio de cultura desidratado e um indicador fluorescente. O meio inoculado é transferido automaticamente pelo TEMPO® Preparo para um cartão contendo três níveis de 16 poços cada, com volume de 225 µL na primeira linha, 22,5 µL na segunda linha e 2,25 µL na terceira linha. O cartão é incubado por

24 horas a 35°C (TEMPO® EB) e após é realizado a leitura no TEMPO® Leitor baseado na fluorescência que calcula o número de poços positivos e expressa automaticamente os resultados em UFC/mL. O TEMPO® EB é baseado na fermentação da glicose pelas *Enterobacteriaceae* causando acidificação do reagente que resulta na extinção da fluorescência nos tubos de reação positiva. (OWEN; WILLIS; LAMPH, 2010; TORLAK; AKAN; GOKMEN, 2008).

Contudo, devido à interferência de variações regionais da microbiota ou da matriz alimentícia, trabalhos de comparação com métodos convencionais de análise devem ser realizados, já que, muitas vezes, características intrínsecas dos alimentos podem interferir nos resultados destas metodologias alternativas (CASAROTTI; PAULA; ROSSI, 2007).

Com base nestas considerações, o objetivo deste trabalho foi comparar o sistema Petrifilm™ EB (3M Company, St. Paul, MN, EUA) e o sistema TEMPO® EB (Biomérieux S.A.) com o método ISO 21528:2 na contagem de *Enterobacteriaceae* em amostras de leite pasteurizado e UHT.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras de leite

Um total de 156 amostras de leite pasteurizado e 15 amostras de leite UHT com inspeção federal (SIF) produzidos no estado de Santa Catarina foram coletadas de diferentes laticínios do estado de Santa Catarina. As amostras foram coletadas e armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, a fim de manter a temperatura inferior a 4°C (BRASIL, 2002). Após, elas foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC.

O conteúdo das embalagens foi homogeneizado por agitação manual. Os pacotes foram limpos com algodão e desinfetados com álcool 70%, após abertos foram retirados um volume de 9 mL, o qual foi transferido para tubos estéreis. Estas amostras foram diluídas com água peptonada (0,1%) (BRITISH STANDARDS INSTITUTION, 1999).

2.2. Contaminação Artificial

Quinze amostras de leite pasteurizado e quinze amostras de leite UHT selecionadas aleatoriamente foram artificialmente contaminadas.

Estas amostras foram divididas em duas porções, uma porção foi contaminada com uma cultura da Família *Enterobacteriaceae* (*Salmonella Typhimurium* ATCC 14028) e outra porção com uma cultura controle negativo, uma cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 02923). As culturas foram reativadas em caldo nutriente (Oxoid, Ltd, Basingstoke, UK) e incubadas a 37 °C por 18 horas (OWEN; WILLIS; LAMPH, 2010). Foram ajustados por técnica de diluição em água peptonada 0,1%, a fim de obter três níveis de inóculo de acordo com Feldsine; Abeyta; Andrews (2002). As amostras de leite foram divididas em quatro porções. A primeira porção (cinco amostras) foi inoculada com 10¹ UFC/mL (baixo nível), a segunda (cinco amostras) com 10² UFC/mL (médio nível), a terceira (cinco amostras) com 10³ UFC/mL (alto nível). Uma quarta porção não foi inoculada, sendo considerada como amostra controle, a qual foi utilizada para o cálculo da diferença da contaminação artificial em relação à contaminação natural do leite, de modo que pudesse ser expresso apenas o valor do inóculo adicionado nos diferentes níveis.

2.3. Análises

Foram analisadas a microflora de 141 amostras de leite pasteurizado, 15 amostras de leite pasteurizado artificialmente contaminado e 15 amostras de leite UHT artificialmente contaminadas através do método ISO 21528:2, sistema PetrifilmTM EB e sistema TEMPO® EB. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

2.4. Técnicas Microbiológicas

2.4.1. Método ISO 21528:2

Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições foram transferidas para placas de petri e adicionados cerca de 10 mL do meio de cultura ágar vermelho violeta bile glicose (VRBG - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) previamente fundido e mantido a 44°C - 47°C em banho-maria. Homogenizou-se cuidadosamente o inóculo com o meio de cultura até total solidificação, sendo então adicionado uma segunda camada (15 mL) com o mesmo meio de cultura deixando-o solidificar e posterior incubação a 37°C por 24 ± 2 horas. Decorrido esse período foi realizada a contagem das colônias de cor rosa a vermelha ou roxa, com ou sem halo de precipitação. Repicaram-se 5 colônias para placas de Ágar nutriente (AN- Oxoid Ltd., Basingstoke,

Hampshire, England) (37°C por 24 ± 2 horas) para posterior confirmação com as provas de oxidase e fermentação em glicose, sendo confirmada como *Enterobacteriaceae* oxidase negativa e glicose positiva (BRITISH STANDARDS INSTITUTION, 2004).

2.4.2. Sistema Petrifilm™

Pelo sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA), as placas EB (*Enterobacteriaceae*) foram inoculadas 1,0 mL de cada uma das diluições e aplicado um difusor para espalhar sobre a superfície da placas de 20 cm². As placas foram incubadas com o lado transparente para cima em estufa de 35°C por 24 horas. Segundo as instruções do fabricante, colônias vermelho com ou sem gás e/ou com zona amarela são consideradas positivas para *Enterobacteriaceae* (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

2.4.3. Sistema TEMPO®

Uma alíquota dos diferentes níveis de inóculos foi transferida para os frascos do TEMPO® EB (Biomérieux S.A.), estas alíquotas foram diluídas e automaticamente transferidas para um cartão contendo 48 poços de três diferentes volumes (16 x 225, 16 x 22,5, 16 x 2,25 µL), usando o Tempo Preparo®. Após incubação por 24 horas a 35°C , realizou a leitura no equipamento Tempo leitor®. Uma vez que a leitura foi concluída, os resultados foram analisados automaticamente pelo sistema de software que determina quais os poços foram positivos. O número de poços positivos obtidos em relação ao volume dos poços e da diluição das amostras, permite a enumeração automática dos resultados em UFC/mL, baseado em tabelas NMP (AOAC RESEARCH INSTITUTE, 2011).

2.5. Análise Estatística

Os valores obtidos foram convertidos em forma logarítmica e, na sequência, os resultados foram submetidos à análise de regressão. Os dados da contaminação artificial foram submetidos à análise de variância (anova). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica® 8.0 (STATSOFT, INC, STATISTICA, 2004).

Para fins de cálculos estatísticos, sempre que os resultados obtidos foram < 1 UFC/ mL, estes resultados foram substituídos pelo número imediatamente inferior, ou seja, 0,9 UFC/mL.

3. RESULTADOS

Pode-se observar que houve concordância entre os diferentes métodos utilizados para a contagem de *Enterobacteriaceae*, observada pelo coeficiente de correlação (r) que demonstrou uma associação linear positiva entre as metodologias, conforme visualizado na Tabela 1. Contagens da microbiota do leite UHT não foram expressos na Tabela 1, pois todas as amostras apresentaram resultado <1 UFC/mL.

Tabela 1. Parâmetros estatísticos obtidos pelo ensaio de *Enterobacteriaceae* (Log UFC/mL) pelo método ISO 21528:2 e o sistema Petrifilm™ EB e entre o método ISO 21528:2 e o sistema TEMPO® EB pela microbiota do leite pasteurizado e artificialmente contaminadas e leite UHT artificialmente contaminadas

Amostras	(N) ^a	ISO 21528- 2:2004	ISO 21528- 2:2004
		x Petrifilm™ EB	x TEMPO® EB
		r ^(b)	r ^(b)
Microbiota leite pasteurizado	141	0,90	0,86
Leite pasteurizado artificialmente contaminado	15	0,98	0,96
Leite UHT artificialmente contaminado	15	0,99	0,99

^a (N)=número de amostras de leite analisadas; ^(b)r= coeficiente de correlação

Em relação à avaliação da contaminação artificial por diferentes níveis de inóculo (baixo, médio, alto), os dados foram submetidos à análise de variância (Tabela 2) e os resultados indicaram que não houve diferença estatística entre os três métodos analisados (método ISO 21528:2, sistema Petrifilm™ EB e sistema TEMPO® EB) para contagem de *Enterobacteriaceae*, tanto no leite pasteurizado como no leite UHT, nos três níveis de inóculos (10^1 , 10^2 , 10^3 UFC/mL) adicionados artificialmente com uma cepa de *Salmonella Typhimurium*.

Os resultados também mostraram que os três métodos analisados para contagem de *Enterobacteriaceae* não identificaram nos três níveis de inóculo (10^1 , 10^2 , 10^3 UFC/mL) nenhuma contagem da cepa *Staphylococcus aureus* adicionada no leite pasteurizado e UHT (Tabela 2).

Tabela 2. Contagens médias em log UFC/mL de *Enterobacteriaceae* e de uma cepa não pertencente à família *Enterobacteriaceae* através do método ISO 21528:2, sistema Petrifilm™ EB e sistema TEMPO® EB em diferentes níveis de inóculo adicionadas artificialmente em amostras de leite pasteurizado e UHT

Cepa	Nível de inóculo**	Método ISO 21528:2		Sistema Petrifilm™ EB		Sistema TEMPO® EB	
		Pasteurizado	UHT	Pasteurizado	UHT	Pasteurizado	UHT
<i>Enterob.</i> *	Baixo	1,41 ^a ±0,06	1,23 ^b ±0,10	1,57 ^a ±0,26	1,24 ^b ±0,03	1,56 ^a ±0,38	1,41 ^b ±0,18
	Médio	2,52 ^a ±0,15	2,54 ^b ±0,16	2,59 ^a ±0,14	2,65 ^b ±0,18	2,59 ^a ±0,10	2,71 ^b ±0,14
	Alto	3,24 ^a ±0,15	3,18 ^b ±0,16	3,37 ^a ±0,08	3,19 ^b ±0,11	3,40 ^a ±0,18	3,36 ^b ±0,09
Não <i>Enterob.</i> *	Baixo	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04
	Médio	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04
	Alto	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04

Médias acompanhadas por letras iguais, na mesma linha e tipo de leite não apresentam diferença estatística ao nível de significância de P <0,05

**Enterobacteriaceae*: *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), Não *Enterobacteriaceae*: *Staphylococcus aureus* (ATCC 02923)

**Nível de inóculo: baixo (1 log UFC/mL), médio (2 log UFC/mL), alto (3 log UFC/mL)

4. DISCUSSÃO

Os coeficientes de correlação obtidos na análise do sistema Petrifilm™ EB com o método ISO 21528:2 (Tabela 1) mostram uma alta correlação na contagem de *Enterobacteriaceae* da microflora de leite pasteurizado, no leite pasteurizado artificialmente contaminado e no leite UHT artificialmente contaminado.

Ferraz; Cerqueira; Souza (2010) também obtiveram uma similaridade entre o sistema Petrifilm EB e o método ISO 21528:2 na contagem de *Enterobacteriaceae* em uma cadeia de produção do leite em pó, sendo analisado leite cru, leite pasteurizado, leite em pó, swab de equipamento e swab de mão.

Os resultados da correlação entre o método ISO 21528:2 e o sistema TEMPO® EB também mostraram uma alta correlação na contagem de *Enterobacteriaceae* na microflora do leite pasteurizado, no leite pasteurizado artificialmente contaminado e no leite UHT artificialmente contaminado conforme Tabela 1.

Coeficientes de correlação menores foram encontrados por Owen; Willis; Lamph (2010) quando avaliaram 209 amostras de alimentos e produtos lácteos com o sistema TEMPO® EB, método do NMP, *pour plate* e *spread plate*, os coeficientes de correlação foram 0.78, 0.75 e 0.78 respectivamente.

Paulsen et al, (2008) avaliaram o TEMPO® EB, o sistema Petrifilm™ EB e o método ISO 21528-2 em 411 alimentos naturalmente contaminados, os resultados não apresentaram diferença significativa entre os métodos, as médias e desvio padrões foram 2.540 ± 1.026 , 2.547 ± 0.995 e 2.456 ± 1.014 log UFC/g para o método ISO 21528-2, Petrifilm™ EB e TEMPO® EB, respectivamente.

Também pode-se observar na Tabela 1 que o coeficiente de correlação obtido da análise da microflora do leite pasteurizado e do leite pasteurizado artificialmente contaminado obtiveram resultados semelhantes na análise de correlação (altos coeficientes de correlação), demonstrando uma boa performance dos métodos alternativos em análises com leite pasteurizado.

A avaliação da contaminação artificial por diferentes níveis de inóculo (10^1 , 10^2 , 10^3 UFC/mL) com uma cepa de *Salmonella Typhimurium* em amostras de leite pasteurizado e leite UHT, indicaram que não houve diferença estatística entre os três métodos analisados (método ISO 21528:2, sistema Petrifilm™ EB e sistema TEMPO® EB) em cada nível de inóculo na contagem de *Enterobacteriaceae*. Esses resultados demonstraram que as metodologias alternativas apresentam

bons resultados de identificação em uma baixa, média e alta contaminação.

Resultado diferente foi encontrado por Silbernagel; Linderberg (2003) em um estudo com contaminação artificial por *Proteus vulgaris* em diferentes níveis de inóculo em amostras de leite avaliando o desempenho do sistema Petrifilm™ EB em comparação método de contagem em placas e o método do NMP. Nesse estudo, os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os métodos em um nível médio de inoculação (10^3 UFC/mL), porém para nível baixo (10^2 UFC/mL) e alto (10^4 UFC/mL) apresentaram diferença estatísticas, sendo o sistema Petrifilm™ EB o que apresentou maior média.

Também pode-se observar que os métodos para detecção de *Enterobacteriaceae* foram específicos, não detectando contagens, quando confrontados com uma cepa não pertencente à família *Enterobacteriaceae* (*Staphylococcus aureus*), e também demonstraram ter sensibilidade uma vez que também detectaram contagens nos diferentes níveis de inóculos testados.

A especificidade e sensibilidade do sistema Petrifilm™ EB pode ser explicada pelo princípio de detecção do método, as placas possuem como meio de cultura o Agar vermelho violeta bile glicose (VRBG) e um corante indicador, o cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio (TTC), este corante é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase do microrganismo, pela formação do precipitado formazán (KORNACKI; JOHNSON, 2001)

No sistema TEMPO® EB o meio de cultura utilizado contém uma molécula fluorescente (4-metil umbelliferone). O crescimento do microrganismo hidrolisa o meio de cultura durante a incubação, ocorre um aumento do pH provocado pela fermentação do carboidrato, resultando na extinção da fluorescência em tubos com reação positiva (OWEN; WILLIS; LAMPH, 2010).

Silbernagel; Lindberg (2002) também realizaram um trabalho semelhante com 174 amostras naturalmente contaminadas e 120 amostras artificialmente contaminadas com três níveis de inóculos (baixo, médio, alto) de produtos lácteos e não lácteos e com 45 cepas puras de não *Enterobacteriaceae* e 65 culturas puras de *Enterobacteriaceae* avaliando o sistema Petrifilm™ EB em comparação método padrão VRBG, os resultados mostraram que o sistema Petrifilm™ EB teve um desempenho igual ou melhor do que o método padrão VRBG e apresentou ser sensível com uma recuperação de 97% das *Enterobacteriaceae* presentes e também seletivo com somente 16%

de não *Enterobacteriaceae* ser capaz de crescer na placa de Petrifilm™ EB.

Owen; Willis; Lamph (2010) também analisaram a sensibilidade e especificidade do sistema TEMPO® EB testando cepas de *Enterobacteriaceae* e não *Enterobacteriaceae* em dois níveis de inóculos (baixo e alto), concluíram que o sistema TEMPO® EB mostrou ser sensível e específico.

De acordo com os resultados, o sistema Petrifilm™ EB e o sistema TEMPO® EB podem ser uma alternativa ao método ISO 21528:2 para ensaio de *Enterobacteriaceae* em leite, visto a boa correlação entre os resultados, agregado a facilidade operacional e a redução do tempo gasto no ensaio microbiológico por estes sistemas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por fornecer os fundos para este estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC RESEARCH INSTITUTE (2011). Certificado nº 050801, de 07/05/2008. EN ISSO 16140. **AFAO AFNOR BIO 12/21-12/06**. TEMPO EB REF 80003. bioMérieux AS.
- BELOTI, V.; SOUZA, J. A.; BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; GUSMÃO, V. V.; MORAES, L. B. Evaluation of Petrifilm™ EC and HS for total Coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34, 301-304, 2003.
- BRASIL. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.
- BRITISH STANDARDS INSTITUTION . Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs – Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination– Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. **ISO 6887-1:1999**. London: BSI, 1999.
- BRITISH STANDARDS INSTITUTION. Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs – Horizontal Methods for the Detection and

Enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony Count Method. **ISO 21528-2:2004**. London: BSI, 2004.

CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66, 278-286, 2007.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. AOAC international methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal AOAC International**, v.85, p. 1187 – 1200, 2002.

FERRAZ, M. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R. Evaluation of Enterobacteriaceae in the powdered Milk production chain using both traditional (ISO 21528-2:2004) and rapid (3M™ Petrifilm™) methods. **Annals of Microbiology**, 60, 373-376, 2010.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**, 27, 710-730, 2010.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In Downes F. P. & Ito, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods** (4th ed., pp. 69-82) Washington: American Public Health Association, 2001.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos Rápidos e Automatizados para Enumeração de Microrganismos Indicadores em Leite – Utilização no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, 21, 115-126, 2000.

OWEN, M.; WILLIS, C.; LAMPH, D. Evaluation of the TEMPO® most probable number technique for the enumeration of *Enterobacteriaceae* in food and dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, 109, 1810-1816, 2010.

PAULSEN, P.; BORGETTI, C.; SCHOPF, E.; SMULDERS, F. J. M. Enumeration of *Enterobacteriaceae* in Various Foods with a New Automated Most-Probable-Number Method Compared with Petrifilm and International Organization for Standardization Procedures. **Journal of Food Protection**, 71, 376-379, 2008.

SILBERNAGEL, K. M.; LINDBERG, K. G. Evaluation of the 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate Method for the Enumeration of *Enterobacteriaceae* in Foods. **Journal of Food Protection**, 65, 1452-1456, 2002.

SILBERNAGEL, K. M.; LINDBERG, K. G. 3M™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate Method for the Enumeration of

Enterobacteriaceae in Selected Foods: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, 86, 802-815, 2003.

STATSOFT, INC, STATISTICA . (2004). Data Analysis Software System, version 8.

TORLAK, E.; AKAN, I.M.; GÖKMEN, M. Comparison of TEMPO® EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. Letters in Applied Microbiology, 47, 566–570, 2008.

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ HS NA CONTAGEM DE COLIFORMES EM LEITE PASTEURIZADO

AValiação DO SISTEMA PETRIFILM™ HS NA CONTAGEM DE COLIFORMES EM LEITE PASTEURIZADO

Andréia Cirolini¹; Andressa Mara Baseggio²; Roberta Juliano Ramos³; Helen da Silva Silvestre¹; Cristhiane Stecanella de Oliveira Cattani¹; Cleide Rosana Werneck Vieira ^{4*}

¹ Estudantes de Pós - graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC

² Bolsista de Iniciação Científica da UFSC

³ Prof do Centro Universitário Estácio de Sá de Santa Catarina

⁴ Prof. do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFSC.

* Autor para correspondência: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rodovia Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: deiacirolini@yahoo.com.br

Artigo a ser submetido à revista: Semina – Ciências Agrárias

RESUMO

Métodos microbiológicos alternativos apresentam vantagens sobre os ensaios convencionais, no entanto é preciso uma confirmação sobre sua eficácia. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o sistema Petrifilm™ HS com o sistema Petrifilm™ EC, CC e a metodologia convencional na contagem de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C em leite pasteurizado. Altas correlações foram encontradas entre as metodologias utilizadas, o coeficiente de correlação apenas foi baixo quando confrontado o sistema Petrifilm™ HS e a metodologia convencional no ensaio de Coliformes a 45°C. As médias não apresentaram diferença estatística entre os três métodos para contagem de Coliformes a 35°C. Na contagem de Coliformes a 45°C a média obtida pelo Sistema Petrifilm™ HS não diferiu estatisticamente do sistema Petrifilm™ CC e da metodologia convencional. Pode-se concluir que o sistema Petrifilm™ HS para contagem de Coliformes a 35°C mostrou resultados satisfatórios em leite pasteurizado e uma baixa performance para a contagem de Coliformes a 45°C.

Palavras-chave: leite pasteurizado, Petrifilm™ HS, microrganismos, metodologia convencional;

ABSTRACT

Alternative microbiological methods present several advantages over conventional methods, but their efficiency should be confirmed. The aim of the present work was to analyze Petrifilm™ HS and Petrifilm™ systems, EC, CC as well as the conventional method for counting Coliforms at 35°C and Coliforms at 45°C in pasteurized milk. High correlations were found among the methods used, but the correlation coefficient was low when comparing Petrifilm™ HS to the conventional method for Coliforms at 45°C. No statistical difference was found among the three methods for Coliforms at 35°C. No statistical difference was found among Petrifilm™ HS, Petrifilm™ CC and the conventional method for Coliforms at 45°C. Petrifilm™ HS system presented satisfactory results for counting Coliforms at 35°C in pasteurized milk but low performance for counting Coliforms at 45°C.

Key-words: pasteurized milk, Petrifilm™ HS, microorganisms, conventional method.

1 INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais utilizados pela população devido a sua riqueza de nutrientes, devido a isso, é importante garantir sua qualidade. A qualidade microbiológica do leite pasteurizado é influenciada pelas condições de processamento e pós-pasteurização (GARRIDO et al., 2001; ICMSF, 2005).

O controle microbiológico em amostras de leite é realizado, principalmente, através da pesquisa de microrganismos indicadores que, quando presentes, podem fornecer informações sobre as condições sanitárias da produção, do processamento, armazenamento e estimativa da vida de prateleira do produto, como também a pesquisa da presença de patógenos (TAMANINI et al., 2007).

Os métodos microbiológicos convencionais empregados para contagem de bactérias foram desenvolvidos no final do século XIX e são usadas até hoje (SENYK et al., 1987). Os métodos convencionais utilizam procedimentos que envolvem a homogeneização, diluições, inoculação em placas com ágar específicos para a formação de colônias e contagem. Muitas vezes, outras etapas também precisam ser realizadas para permitir que microrganismos lesados por tratamentos físicos e químicos recuperem-se e multipliquem até níveis detectáveis (FORSYTHE, 2002).

Os métodos microbiológicos convencionais embora confiáveis e eficientes exigem disponibilidade de tempo e grande trabalho laboratorial (MANORLY et al., 2003; SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006). Desta forma, métodos alternativos têm sido desenvolvidos para obter o resultado final em menos tempo. Tais métodos são bastante desejáveis na indústria de alimentos, apesar das técnicas poderem ser mais caras e requererem pessoal com alto nível de treinamento (FORSYTHE, 2002).

Como destaca Franchin (2008), um tempo longo para a análise prolonga a tomada de ações corretivas e preventivas em casos de desvios de qualidade do processo, quando monitorados por análises microbiológicas. Em virtude disto, a busca de novos métodos, que reduzam o tempo para o resultado final, desde que comprovada sua eficácia, leva a solução de possíveis problemas de ordem microbiológica durante a produção de alimentos no nível industrial.

Um dos métodos alternativos utilizados para contagem de microrganismos em alimentos é o sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA), constituído por um sistema de filme duplo. A base do cartão é revestido de polietileno, recoberto por um meio de cultura desidratado que contém um agente geleificante solúvel em água fria e nutrientes, o filme superior é transparente, removível que contém um corante indicador (FRANCO; LANDGRAF, 2005). As placas de Petrifilm™ EC e CC são uma alternativa rápida para a contagem de Coliformes. As placas de contagem de Coliformes possuem como meio de cultura base o ágar vermelho violeta bile (VRB), corante indicador 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e agentes geleificantes (NERO; BELOTI; BARROS, 2000). As placas de Petrifilm™ para contagem de Coliformes possuem uma variante chamada de placa de alta sensibilidade (HS), esta placa é idêntica a placa comum de contagem de Coliformes, porém permite a inoculação de 5 mL de homogeneizado de alimento (FRANCO, 1994).

Alguns aspectos importantes do alimento podem influenciar o desempenho dos métodos alternativos como, por exemplo, o pH, a atividade de água, a presença de conservantes, certos componentes, como lipídios e sais e a cor do alimento. Estes podem interferir com as reações enzimáticas em que os resultados positivos destes métodos são baseados e influenciar negativamente o seu desempenho (TAVOLARO et al., 2005; CASAROTTI; PAULA; ROSSI, 2007).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o sistema Petrifilm™ HS com sistema Petrifilm™ EC, CC e a metodologia convencional de contagem de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C

em leite pasteurizado produzido em laticínios do Estado de Santa Catarina - Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram coletadas 141 amostras (sacos de um litro) de seis (6) laticínios com sistema de Inspeção Federal (SIF), do estado de Santa Catarina-Brasil no período entre dezembro de 2009 e novembro de 2011. A coleta foi realizada por um fiscal sanitário do Ministério da Agricultura (SFA/SC), responsável pela fiscalização da indústria.

As amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, a fim de manter a temperatura inferior a 4°C (BRASIL, 2002). Após, foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foi realizada a verificação da temperatura com termômetro digital (Wertern®).

2.2. Análises Microbiológicas

O conteúdo das embalagens foi homogeneizado por agitação manual. Os sacos antes de serem abertos foram limpos com algodão e desinfetados com álcool 70%. Foram realizadas as diluições decimais, utilizando-se água peptonada (0,1%) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) (BRASIL, 2003).

Foram realizados ensaios de contagem de Coliformes a 35°C pelo sistema Petrifilm™ HS, EC e pela metodologia convencional. Coliformes a 45°C foi realizado pelo sistema Petrifilm™ HS, CC e pela metodologia convencional.

2.2.1 Sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA)

Pelo sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA), as placas HS para contagem de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C foram inoculadas com 5 mL da amostra e incubadas a 35°C e 44 °C, respectivamente por 24 horas. Foi realizada a contagem de colônias vermelhas associadas com bolhas de gás. As placas EC para contagem de Coliformes a 35°C e as placas CC para contagem de Coliformes a 45°C foram inoculadas com 1,0 mL da amostra. As placas EC foram incubadas a 35°C por 24 horas e as placas CC foram incubadas a 44°C

por 24 horas, decorrido o tempo de incubação, realizou-se à leitura das placas que apresentavam colônias vermelhas associadas com bolhas de gás. (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

2.2.2 Metodologia Convencional

Os ensaios de Coliformes a 35°C foram realizadas de acordo com Davidson, Roth e Gambrel-Lenarz (2004) e Coliformes a 45°C de acordo com Brasil (2003). Alíquotas de 1,0 mL das diluições foram transferidas para placas de petri em duplicata e adicionado ágar vermelho violeta bile (VRBA - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e incubadas 32°C \pm 1°C por 24 horas. Realizou-se a contagem das colônias vermelhas de 5 mm. Três a cinco colônias foram transferidas para tubos de Caldo Verde Brilhante 2% lactose (BVB - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e para tubos com Caldo *Escherichia coli* (EC - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) para confirmação de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C, respectivamente. Os tubos de BVB foram incubados a 35°C (\pm 1°C) por 48 horas e os tubos de EC em banho-maria a 45,0°C (\pm 0,2°C) por 48 horas. O resultado final de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C foi expresso a partir da positividade dos tubos, caracterizada pela turvação e pela produção de gás em cada tubo individualmente.

2.3 Análise Estatística

Os valores obtidos foram convertidos em forma logarítmica e, na sequência, os resultados foram submetidos à análise de regressão e análise de variância (Anova). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica® 8.0 (STATSOFT, INC, STATISTICA).

Para fins de cálculos estatísticos, sempre que os resultados obtidos foram <1UFC/mL, estes resultados foram substituídos pelo número imediatamente inferior, ou seja, 0,9UFC/mL

3. RESULTADOS

Pode-se observar concordância entre os diferentes métodos utilizados para a contagem de Coliformes a 35°C, observados pelo coeficiente de correlação (r) que demonstrou uma associação linear positiva entre as metodologias, conforme visualizado na Tabela 1.

O resultado da correlação no ensaio de Coliformes a 45°C entre o sistema Petrifilm™ HS e a metodologia convencional foi baixa, no entanto demonstrou uma alta correlação quando confrontado com o sistema Petrifilm™ CC (Tabela 1).

Tabela 1 – Coeficiente de Correlação (r) obtido pelo ensaio de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C (Log UFC/mL) pelo método Petrifilm™ HS frente ao método convencional e sistema Petrifilm™ EC e CC em amostras de leite pasteurizado provenientes de laticínios do estado de SC

Microrganismos	Petrifilm™ HS x Convencional	Petrifilm™ HS x Petrifilm™ EC	Petrifilm™ HS x Petrifilm™ CC
Coliformes a 35°C	0,88	0,93	-*
Coliformes a 45°C	0,20	-*	0,89

*Análise não realizado pelo método

Os dados quando submetidos à análise de variância indicaram que não houve diferença estatística entre os três métodos analisados (Petrifilm™ HS, sistema Petrifilm™ EC e método convencional) para contagem de Coliformes a 35°C. Na contagem de Coliformes a 45°C a média obtida pelo sistema Petrifilm™ HS não diferiu estatisticamente do sistema Petrifilm™ CC e da metodologia convencional, no entanto, estes foram estatisticamente diferentes entre si (Tabela 2).

Tabela 2. Contagens médias em log₁₀ UFC/mL de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C através do sistema Petrifilm™ HS, EC, CC e método convencional em amostras de leite pasteurizado

Microrganismo	Sistema Petrifilm™ HS	Sistema Petrifilm™ EC	Sistema Petrifilm™ CC	Método Convencional
Coliformes a 35°C	0,47 ^a ±1,17	0,50 ^a ±1,03	-*	0,62 ^a ±1,21
Coliformes a 45°C	0,10 ^{ab} ±0,52	-*	0,19 ^a ±0,64	0,04 ^b ±0,36

Médias acompanhadas por letras iguais, na mesma linha não apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5%

*Análise não realizada pelo método

Pode-se visualizar na Tabela 3 o tempo (em horas) para o resultado final entre as metodologias utilizadas para o ensaio de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C. Observa-se que a metodologia convencional necessita de mais 48 horas para a emissão do resultado final comparado com o sistema Petrifilm™.

Tabela 3. Tempo (em horas) para o resultado final do ensaio de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C pelo sistema Petrifilm™ HS, EC e CC e pela metodologia convencional

Microrganismo	Sistema Petrifilm™ HS	Sistema Petrifilm™ EC	Sistema Petrifilm™ CC	Método Convencional
Coliformes a 35°C	24	24	-*	72
Coliformes a 45°C	24	-*	24	72

*Análise não realizada pelo método

4. DISCUSSÃO

A alta correlação encontrada entre o sistema Petrifilm™ HS com a metodologia convencional e o sistema Petrifilm™ EC na contagem de Coliformes a 35°C, estão de acordo com resultados encontrados por Beloti et al (2003) analisando Coliformes a 35°C em 145 amostras de água, foi encontrado um coeficiente de correlação de 0,90 entre o sistema Petrifilm™ HS e a técnica do Número Mais Provável (NMP). No entanto, esta metodologia convencional utilizada no trabalho de Beloti et al (2003) difere da utilizada em nosso estudo (contagem em placas).

As placas Petrifilm™ de contagem de Coliformes possuem como meio de cultura seletivo, o ágar vermelho violeta bile (VRB) e o corante indicador tetrazólio (TTC), que vão formar colônias vermelhas pela redução do TTC e bolhas de gás provocadas pela fermentação da lactose (NERO; BELOTI; BARROS, 2000). As placas HS (alta sensibilidade) apenas possuem o diferencial que são inoculadas 5 mL de amostra ao invés de 1 mL nas placas Petrifilm™ convencionais.

A análise de variância mostrou que os resultados do ensaio de Coliformes a 35°C não apresentaram diferença estatística entre as metodologias testadas. Enfatizando que o sistema Petrifilm™ HS apresenta uma performance semelhante a metodologia convencional em amostras de leite pasteurizado. Raybaudi et al (2005) encontraram

diferença estatística na contagem de Coliformes, em amostras de leite pasteurizado, comparando o sistema Petrifilm™, método do Número Mais Provável e um método proposto por Shertha and Sinha em 1990 usando violet red bile (VRB) .

Também pode se observar uma redução do tempo (48 horas) para a emissão do resultado final de Coliformes a 35°C pelo sistema Petrifilm™ em comparação a metodologia convencional. Aliado a isso a metodologia alternativa apresenta uma melhor praticidade laboratorial, pela redução do material utilizado em laboratório, preparo dos meios de cultura e do volume de resíduos gerados durante o ensaio.

Em relação à contagem de Coliformes a 45°C a análise de regressão mostrou uma baixa correlação entre o sistema Petrifilm™ HS e o método convencional. Observa-se que a empresa 3M™ tem projetado placas para a enumeração de Coliformes e *Escherichia coli*, com aprovação da AOAC, Association Française de Normalização (AFNOR) e pelo Comité Nórdico de Análises Alimentares (NMKL). Porém, ainda não desenvolveram placas específicas para contagem de Coliformes a 45°C, a 3M e AFNOR sugerem o uso de placas de Coliformes 35°C para encontrar Coliformes a 45°C incubando as placas a 44°C (ORTIZ e RIOS, 2006).

A alta correlação encontrada entre o sistema Petrifilm™ HS e o sistema Petrifilm™ CC é justificada, pois as duas placas apresentam o mesmo mecanismo de detecção, possuem como meio de cultura base o ágar vermelho violeta bile (VRB), corante indicador 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e agentes geleificantes (NERO; BELOTI; BARROS, 2000), sendo a única diferença o volume de amostra inoculado na placa, sendo a placa HS inoculado 5 mL e a placa CC inoculado 1 mL.

No entanto, a análise de variância mostrou que o sistema Petrifilm™ HS não diferiu dos outros métodos, para contagens dos Coliformes a 45°C, além de apresentar uma redução do tempo do ensaio até a emissão do resultado final quando comparado com a metodologia convencional, contribuindo desta forma, para possíveis tomadas de decisões sobre o produto.

Pode-se concluir que o sistema Petrifilm™ HS mostrou resultados satisfatórios para o ensaio de Coliformes a 35°C e uma baixa performance para Coliformes a 45°C em leite pasteurizado. Desta forma, o sistema Petrifilm™ HS pode ser uma alternativa à metodologia convencional para ensaio de Coliformes a 35°C em leite pasteurizado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELOTI, V.; SOUZA, J. A.; BARROS, M. A. F.; NERO, L.A.; MATTOS, M. R.; GUSMÃO, V. V.; MORAES, L. B. Evaluation of Petrifilm™ EC and HS for Total Coliforms and *Escherichia coli* enumeration in Water. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 301-304, 2003.
- BRASIL. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003.
- CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n. 3, p. 278-286, 2007.
- DAVIDSON, P. M.; ROTH, L. A. GAMBREL-LENARZ, S. A. Coliform and other Indicator Bacteria. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, American Public Health Association: Washington, 2004, p.187-203.
- FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. AOAC international methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal AOAC International**, v.85, p. 1187 – 1200, 2002.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2002, p. 424.
- FRANCHIN, P. R. **Comparação de Metodologias Alternativas para Detecção de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em Carnes e Produtos Cárneos**, 2008. 114 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.

FRANCO, B. D. G. M. **Métodos rápidos de análise microbiológica de Alimentos: Estudo crítico e Avaliação de novas Metodologias**, 1994. 133 f. Tese (Livre- Docência junto ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1994.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GARRIDO, N. S.; MORAIS, J. M.; BRIGANTI, R. C.; OLIVEIRA, M. A.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, S. A. V.; FÁVARO, R. M. D. Avaliação da qualidade físico química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n.2, p. 141-146, 2001.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in food 6 - Microbial Ecology of food commodities**, 2^a ed. New York, 2005.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, American Public Health Association: Washington, 2001, p.69-82.

MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RADSTROM, P.; COOK. N.; WAGNER, M.;

HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne

pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos Rápidos e Automatizados para Enumeração de Microrganismos Indicadores em Leite – Utilização no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n.1, p. 115-126, 2000.

ORTIZ, L. M.; RIOS, M. S.; Comparación de los métodos PetrifilmTM coliformes y Número Más Probable (NMP) para la determinación de coliformes fecales en muestras de queso blanco. **Revista Del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, v.37, n.2, p.15-18, 2006.

RAYBAUDI, R. M.; ZEA, Z. A.; CURINI, G.; MARTINEZ, A. J. Y. Comparison of a Rapid Procedure with the MNP and Petrifilm Methods for the detection of Coliforms in Pasteurized Milk. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.13, p.11-18, 2005.

SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os

métodos rápidos Simplate TPC-CI e Petrifilm AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 22, n. 1, p. 60-64, 2002.

SENYK, G.F.; KOZLOWSKI, S.M.; NOAR, P.S.; SHIPE, W.F.; BANDLER, D.K.

Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1152-1158, 1987.

SILVA M.P., CAVALLI D. R., OLIVEIRA T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n. 2, p. 352-359, 2006.

STATSOFT, INC, STATISTICA (Data Analysis Software System), version 8, www.statsoft.com. 2004.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 3, p. 449-454, 2007.

TAVOLARO, P.; FERRATI, A. R.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. **Brazilian journal of microbiology**, v. 36, p. 295-300, 2005.

CONCLUSÃO GERAL

No primeiro capítulo deste trabalho foi realizada uma fundamentação teórica sobre os principais temas abordados, o que serviu para destacar a importância da pesquisa com amostras de leite e a avaliação de diferentes métodos para enumeração e detecção de microrganismos, visto a grande produção deste alimento no Brasil, e a sua grande suscetibilidade a contaminação microbiológica.

Em relação aos objetivos propostos no segundo capítulo sobre a avaliação da qualidade do leite, os resultados obtidos permitem concluir que as amostras de leite cru enfrentam dificuldades de adequação a legislação, já que os resultados mostraram altos níveis de contaminação por microrganismos mesófilos aeróbios e psicotróficos.

No leite pasteurizado foram encontradas contagens fora do padrão permitido pela legislação para microrganismos mesófilos aeróbios, *Enterobacteriaceae*, Coliformes a 35°C, *Escherichia coli* e também altas contagens de microrganismos psicotróficos, destacando a importância de um controle mais rigoroso com a matéria prima, na cadeia de processamento, na higiene de equipamentos e de manipuladores e com o produto após a pasteurização. Apenas a contagem de Coliformes a 45°C apresentou resultados abaixo do permitido pela legislação, além das contagens de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e *Escherichia coli* O157H7 que não foram identificadas.

No leite UHT baixas contagens microbiológicas encontradas permitem concluir que o processamento aplicado foi capaz de eliminar a carga microbiana.

Em relação à comparação dos métodos alternativos com a metodologia convencional, abordados no terceiro capítulo, pode-se concluir que o sistema Petrifilm™ e o sistema TEMPO® mostraram resultados satisfatórios para o ensaio de Coliformes a 35°C em leite pasteurizado e uma baixa *performance* para mesófilos aeróbios e Coliformes a 45°C e *Escherichia coli*. Desta forma, o sistema Petrifilm™ e o sistema TEMPO® podem ser uma alternativa à metodologia convencional para ensaio de Coliformes a 35°C em leite pasteurizado, visto a boa correlação entre os resultados.

No quarto capítulo, quando foi avaliado o sistema Petrifilm™ EB o sistema TEMPO® EB com a metodologia convencional para contagem de *Enterobacteriaceae* na microflora do leite pasteurizado e em amostras de leite pasteurizado e UHT artificialmente contaminadas, os resultados mostraram que o sistema Petrifilm™ EB e o sistema

TEMPO® EB podem ser uma alternativa ao método ISO 21528:2 para ensaio de *Enterobacteriaceae* em leite, visto a boa correlação entre os resultados, agregando a facilidade operacional e a redução do tempo gasto no ensaio microbiológico por estes sistemas.

No quinto capítulo, em relação ao sistema Petrifilm™ HS (alta sensibilidade) os resultados foram satisfatórios para o ensaio de Coliformes a 35°C, desta forma podem ser considerado uma alternativa à metodologia convencional para ensaio de Coliformes a 35°C em leite pasteurizado.

Pode-se concluir que a qualidade do leite cru e pasteurizado provenientes de laticínios do Estado de SC apresentam problemas de qualidade microbiológica e as metodologias alternativas avaliadas apresentaram bons resultados para Coliformes a 35°C e *Enterobacteriaceae* em relação à metodologia convencional, além da redução do tempo de realização do ensaio aliada a uma economia de material e mão de obra, desta forma sua utilização deve ser estimulada.

ANEXOS

ANEXO 1- Aceite do artigo pela revista Brazilian Journal of
Microbiology

Section Editor
2012-10-30 04:02 PM

Brazilian Journal of Microbiology

Subject: [BJM] Editor Decision

Dra Cleide Rosana Werneck Vieira:

We have reached a decision regarding your submission to Brazilian Journal of Microbiology, "Evaluation of the Petrifilm™ EB and TEMPO® EB systems with ISO 21528-2:2004 method for the count of Enterobacteriaceae in milk".

Our decision is to accept for publication.

Thank you for having chosen BJM to publish your study.

Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo
BJM Associate Editor
tondo@ufrgs.br
Brazilian Journal of Microbiology